

Effizienz einer Azathioprintherapie bei Patienten mit rheumatischen Erkrankungen

Relevanz der Genotypisierung der Thiopurinmethyltransferase (TPMT)

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Dipl. pharm. Astrid Scheuerlein
geboren am 12.02.1972 in Hof / Saale
Jena 2013

Gutachter:

1. PD Dr. rer. nat. Marion Hippus, Jena
2. PD Dr. phil. nat. Andreas Seeling, Jena
3. Prof. Dr. rer. nat. Burkhard Hinz, Rostock

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.01.2014

Abkürzungsverzeichnis

6-MMP	6-Methylmercaptapurin
6-MP	6-Mercaptopurin
6-TG	6-Thioguanin
6-TGN	6-Thioguanin-nukleotide
6-TIMP	6-Thioinosin-monophosphat
6-TITP	6-Thioinosin-triphosphat
6-TXMP	6-Thioxanthin-monophosphat
ABC	Abatacept
ADM	Adalimumab
ALL	Akute lymphatische Leukämie
ANF	antinukleäre Faktoren
AZA	Azathioprin
CD 20	Cluster of Differentiation, immunphänotypisches Oberflächenmerkmal von Zellen
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
CEZ	Certolizumab
CiA	Ciclosporin A
COX	Cyclooxygenase
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
DGRh	Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie
DMARD	Disease modifying antirheumatic drugs
dsDNA	Doppelstrang-DNA-Antikörper
ETC	Etanercept
FI	Fachinformation
GMPS	Guanosin-Monophosphat-Synthetase
GOM	Golimumab
HCQ	Hydroxychloroquin
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HLA-DR4	Humanes Leukozyten Antigen, lokalisiert in der DR-Region

IgG	Immunglobulin Klasse G, Gammaglobulin
IgM	Immunglobulin Klasse M
IL-1, IL-2, IL-6	Interleukin 1, 2, 6
IMPDH	Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase
INX	Infliximab
ITPase	Inosin-Triphosphat-Pyrophosphohydrolase
KG	Körpergewicht
LEF	Leflunomid
MMF	Mycophenolat-Mofetil
MMPN	Methyl-mercaptopurin-nukleotide
M-TGN	Methyl-thioguanin-nukleotide
MTX	Methotrexat
NF- κ B	Nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells
NSAR	Nicht-steroidale Antirheumatika
PRDP	Phosphoribosyl-Diphosphat
RA	Rheumatoide Arthritis
Rac-1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RIX	Rituximab
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
SNP	single nucleotide polymorphism
SSZ	Sulfasalazin
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TOZ	Tocilizumab
TPMT	Thiopurin-S Methyl-Transferase
TU	Thioharnsäure (Thiouric-Acid)
UAW	Unerwünschte Arzneimittelwirkung(en)
VNTR	Variable number tandem repeat
XO	Xanthin-Oxidase
ZNS	Zentralnervensystem

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
Inhaltsverzeichnis	3
Zusammenfassung.....	5
1. Einleitung	7
1.1. Rheumatologische Erkrankungen	8
1.1.1. Rheumatoide Arthritis.....	8
1.1.1.1. Therapie der rheumatoiden Arthritis.....	10
1.1.2. Systemischer Lupus erythematodes (SLE)	12
1.1.2.1. Therapie des Systemischen Lupus erythematodes	13
1.2. Azathioprin	14
1.2.1. Dosierung	14
1.2.2. Pharmakokinetik	14
1.2.2.1. Absorption, Verteilung, Ausscheidung.....	15
1.2.2.2. Metabolismus.....	16
1.2.3. Wirkmechanismus	18
1.2.3.1. Hemmung der Purinbiosynthese	19
1.2.3.2. Erhöhung der Apoptoserate.....	20
1.2.3.3. Hemmung der Genexpression.....	22
1.2.3.4. Weitere Effekte	23
1.2.4. Unerwünschte Wirkungen	23
1.2.5. Wechselwirkungen	25
1.2.6. Kontraindikationen.....	27
1.3. Thiopurinmethyltransferase (TPMT).....	27
1.3.1. Genetischer Polymorphismus	29
1.3.2. TPMT-Gen.....	30
1.3.3. Möglichkeiten zum Monitoring der Azathioprintherapie	31
1.3.3.1. Therapeutisches Drug Monitoring	32
1.3.3.2. TPMT-Screening	32
1.3.3.2.1. Phänotypisierung	33
1.3.3.2.2. Genotypisierung	34
2. Ziele	35
3. Methoden	36
3.1. Patienten	36
3.2. Einteilungs- und Beurteilungskriterien	37
3.3. Genotypisierung	38
3.3.1. PCR.....	38
3.3.2. Gelelektrophorese.....	39
3.4. Statistische Auswertung	40
4. Ergebnisse	41
4.1. Geschlecht und Erkrankung	41
4.2. Alter	41
4.3. Genotyp	42
4.4. Therapiedauer	44
4.5. Azathioprindosis.....	48
4.5.1. Dosis und Outcome	50

4.5.2.	Dosis, Genotyp und Outcome	51
4.6.	Outcome	52
4.4.1.	Genotyp und Outcome	54
4.4.2.	Genotyp und positiver Effekt	58
4.4.3.	Genotyp und Leukopenie	61
4.7.	Einzelfallbeschreibung	63
4.7.1.	Patienten mit Leukopenie	63
4.7.2.	Patienten mit Leberwerterhöhung	65
4.7.3.	Patient mit Pankreatitis.....	66
5.	Diskussion	67
5.1.	Geschlecht.....	70
5.2.	Genotyp.....	71
5.3.	Therapiedauer	71
5.4.	Azathiopridosis.....	73
5.5.	Outcome	74
5.6.	Outcome und Genotyp.....	75
5.7.	Einzelfälle	78
5.8.	Toxische Metaboliten.....	81
5.9.	Zusätzliche am Azathioprinstoffwechsel beteiligte Enzyme	83
5.9.1.	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT)	83
5.9.2.	Xanthinoxidase (XO).....	83
5.9.3.	Inosin-triphosphat-pyrophosphatase (ITPase).....	84
5.9.4.	Variable number tandem repeats (VNTR).....	84
5.10.	Resümee.....	85
6.	Schlussfolgerungen	87
	Literaturverzeichnis.....	89
	Anhang	99
	SOP 1	99
	SOP 2	100
	SOP 3	101
	SOP 4	102
	SOP 5	103
	Danksagung.....	104
	Ehrenwörtliche Erklärung.....	105

Zusammenfassung

Azathioprin ist ein potentes Immunsuppressivum, das von George Hitchings und Gertrude Elion entwickelt wurde und seinen festen Platz in der Therapie der rheumatoiden Arthritis hat. Die rheumatoide Arthritis ist eine chronisch entzündliche Erkrankung des Bindegewebes, von der rund 1 % der Bevölkerung betroffen ist und die unbehandelt zu einer frühzeitigen Zerstörung der Gelenke führt. Trotz der guten Wirksamkeit von Azathioprin kommt es jedoch häufig wegen unerwünschter Arzneimittelwirkungen (Leukopenien, Pankreatitis, Leberfermenterhöhung, gastrointestinale Beschwerden), aber auch wegen Unwirksamkeit, zu einem Abbruch der Azathioprintherapie.

Azathioprin ist ein Prodrug, aus dem zunächst 6-Mercaptopurin entsteht. 6-Mercaptopurin wird anschließend in einem mehrstufigen Abbauprozess in 6-Thionukleotide umgewandelt, die die eigentliche Wirkform darstellen und unter anderem als „falsche Bausteine“ in DNA und RNA eingebaut werden, zugleich aber auch für die toxische Wirkung verantwortlich sind. Im Metabolismus von Azathioprin nimmt die Thiopurin-S-Methyltransferase eine zentrale Rolle ein und es scheint eine inverse Beziehung zwischen der Thiopurin-S-Methyltransferase-Aktivität und der Konzentration an 6-Thionukleotiden zu bestehen. Die Aktivität der Thiopurin-S-Methyltransferase unterliegt großen interindividuellen Schwankungen, die hauptsächlich mit einem genetischen Polymorphismus in Verbindung gebracht werden. Homozygot defiziente Träger des Thiopurin-S-Methyltransferase-Gens weisen eine fehlende Aktivität auf, was zu einer azathioprin-induzierten Knochenmarksuppression führt, da sich nun die 6-Thionukleotide maximal anreichern können. Davon sind etwa 0,3 % der kaukasischen Bevölkerung betroffen. Rund 11 % sind heterozygote Allelträger und man findet eine unterschiedliche Enzymaktivität und Konzentration an 6-Thionukleotiden, während homozygote Wildtypträger (ca. 89 % der kaukasischen Bevölkerung) über eine hohe Aktivität der Thiopurin-S-Methyltransferase verfügen.

Aufgrund dieses Polymorphismus wird vermutet, dass sich durch Genotypisierung der Patienten vor Azathioprintherapie vorhersagen lässt, ob die Patienten von der Therapie profitieren werden und mit welcher Dosis sie therapiert werden sollten, um keine Leukopenie zu entwickeln.

In der vorliegenden Arbeit sollte an Patienten mit entzündlich rheumatischen Erkrankungen überprüft werden, ob tatsächlich eine Korrelation zwischen Genotyp und dem Therapieeffekt von Azathioprin besteht.

Dazu wurden retrospektiv 75 Patienten aus dem Universitätsklinikum Jena, Funktionsbereich Rheumatologie & Osteologie, ermittelt, die an einer Erkrankung des rheumatischen Formenkreises litten und im Zeitraum von 1979 bis 2006 mit Azathioprin behandelt wurden. Von diesen Patienten bestimmten wir den Genotyp sowie Erkrankung, Azathioprindosierung, Komedikation, Laborparameter, Behandlungsdauer und Behandlungserfolg und überprüften diese Faktoren auf einen statistischen Zusammenhang hin. Aufgrund der geringen Anzahl von Patienten mit Leukopenie führten wir außerdem eine Einzelfallbetrachtung durch.

Von den 75 Patienten waren 86,7 % Wildtypträger und 13,3 % heterozygot. Unter den Wildtypträgern zeigten 80 % einen positiven therapeutischen Effekt, bei 4,6 % blieb die Therapie wirkungslos und 15,4 % entwickelten eine unerwünschte Wirkung, wobei 4,6 % aller Patienten eine Leukopenie hatten. Bei den Heterozygoten profitierten 70 % von der Therapie, bei 10 % blieb die Therapie wirkungslos und 20 % bekamen eine Leukopenie. Ein statistischer Zusammenhang mit dem Genotyp konnte für keines der genannten Ereignisse ermittelt werden, was auch die Auswertung der Einzelfälle bestätigt.

Dies ist unter anderem darauf zurück zu führen, dass neben der Thiopurin-S-Methyltransferase noch weitere Enzyme am Azathioprinmetabolismus beteiligt sind, deren Einfluss noch genauer untersucht werden muss, und dass nicht nur die 6-Thionukleotide die Wirkung bzw. Leukopenie hervorrufen, sondern auch noch andere Metaboliten toxische Effekte verursachen können.

Die Ergebnisse dieser Studie sowie auch der Vergleich mit der Literatur hat gezeigt, dass durch Genotypisierung keine konkrete Vorhersage möglich ist, ob ein Patient von der Therapie profitieren wird und mit welcher Dosis man ihn behandeln sollte, damit er keine Leukopenie bzw. unerwünschte Wirkung entwickelt.

Aufgrund der in dieser Studie gefundenen Ergebnisse lautet deshalb die Empfehlung für den klinischen Alltag, dass man die Therapie mit einer niedrigen Azathioprindosis beginnen sollte, um die Dosis unter engmaschigen Blutbildkontrollen langsam zu steigern, bis ein optimaler Effekt ohne das Auftreten von Nebenwirkungen erreicht wird.

1. Einleitung

Das Immunsuppressivum Azathioprin wurde von George Hitchings und Gertrude Elion entwickelt, die 1988 zusammen mit Sir James Black of London „für ihre wegweisenden Entdeckungen wichtiger biochemischer Prinzipien der Arzneimitteltherapie“ den Nobelpreis für Medizin und Physiologie erhielten.

Gertrude Elion synthetisierte 1950 bei ihren Forschungen zu Nukleinsäuren ein Purin, das die Vermehrung von Leukämiezellen hemmte. Aufgrund seiner Toxizität im Tierversuch veränderte Elion die chemische Struktur des synthetisierten Purins und erhielt auf diese Weise 6-Mercaptopurin (6-MP). Durch den Einsatz von 6-MP ließ sich ein sofortiger Stopp des Tumorwachstums bei Mäusen beobachten. Relativ schnell ging man zu klinischen Studien über, in denen 6-MP bei Kindern mit akuter Leukämie eingesetzt wurde (Elion 1989). Aufgrund seiner guten Wirksamkeit wurde 6-MP bereits 2 Jahre nach seiner Synthese zur Behandlung der akuten Leukämie bei Kindern durch die Food and Drug Administration (FDA) zugelassen. Durch den Einsatz von 6-MP verlängerte sich die Überlebenszeit der Kinder von durchschnittlich 3 – 4 Monaten auf 12 Monate, bei einigen konnte sogar eine Remission über ein Jahr erzielt werden (Elion 1989).

Um 6-MP vor rascher Methylierung und Oxygenierung zu schützen und somit zu garantieren, dass die aktive Substanz langsamer freigesetzt wird, wurden Derivate des 6-MP synthetisiert. So entstand durch Substitution eines Imidazolrestes Azathioprin, das bei Mäusen bei geringerer Toxizität die gleiche Aktivität wie 6-MP zeigte (Elion 1989). Elion und Hitchings stellten Azathioprin einem britischen Forscherteam zur Verfügung, welches zu dieser Zeit die Wirkung von 6-MP auf das Immunsystem erforschte. Dieses Team entdeckte eine gute Wirksamkeit bei Organtransplantationen bei Hunden und Anfang der 60er Jahre konnte Azathioprin in die Transplantationsmedizin eingeführt werden (Elion 1989).

Weitere Studien belegten den immunsuppressiven Effekt von Azathioprin und so wurde es auch zur Therapie der autoimmunen Hepatitis, der autoimmunhämolytischen Anämie und des Systemischen Lupus erythematoses mit Erfolg eingesetzt (Elion 1989).

Heute werden Azathioprin und 6-MP zur Behandlung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (CED), lymphoblastischer Leukämien (ALL), zur Immunsuppression bei Autoimmunerkrankungen und Transplantationen sowie zur Therapie entzündlich rheumatischer Erkrankungen verwendet.

Innerhalb der entzündlich rheumatischen Erkrankungen setzt man Azathioprin hauptsächlich zur Therapie des Systemischen Lupus erythematoses (SLE) und anderen aktiven Kollagenosen ein, es leistet aber auch in der Behandlung therapeutisch schwer zu beeinflussender Formen der rheumatoiden Arthritis (RA) gute Dienste (Hettenkofer 2003). Es führt zu einer Reduktion oder sogar Remission der Erkrankung und trägt zur Einsparung von Steroiden bei.

In den neuen S1-Leitlinien der DGRh zur medikamentösen Therapie der rheumatoiden Arthritis 2012 wird Azathioprin hauptsächlich zur Behandlung therapierefraktärer RA oder bei Kontraindikationen gegen klassische DMARDs empfohlen (DGRh 2012).

1.1. Rheumatologische Erkrankungen

Unter dem Oberbegriff Rheuma werden mehr als 200 verschiedene Syndrome zusammengefasst, die sich nicht allein auf den Bewegungsapparat beschränken, sondern auch Binde- und Fettgewebe sowie Muskulatur, Nerven und Sehnen betreffen können.

Innerhalb der rheumatologischen Erkrankungen unterscheidet man zwischen nicht entzündlichen bzw. degenerativen und entzündlichen rheumatischen Krankheitsbildern.

Letztere werden in die vier Untergruppen der rheumatoiden Arthritiden, Spondarthritiden, Kollagenosen und Vaskulitiden unterteilt (Hettenkofer 2003, Puchner 2010, Hatz 2007).

Im Folgenden soll vornehmlich die rheumatoide Arthritis im Vordergrund stehen.

1.1.1. Rheumatoide Arthritis

Die rheumatoide Arthritis (auch chronische Polyarthritiden, RA) ist eine chronisch entzündliche und meist progredient verlaufende Systemerkrankung des Bindegewebes mit Destruktion der Gelenke. Sehnen, Sehnenscheiden, Schleimbeutel sowie Augen und innere Organe können ebenfalls betroffen sein. In rund 65 % der Fälle beginnt die RA schleichend mit unspezifischen Symptomen, wie z. B. einer ausgeprägten Adynamie, vegetativen Störungen und Nachtschweiß. Es folgt die bekannte Morgensteifigkeit, zu Beginn oft ohne Schwellungen. Erst im weiteren Verlauf treten die typischen Gelenkschmerzen auf. Bei ca. 15 % der Patienten kommt es zu einem akuten Beginn mit starken Schmerzen und Schwellungen von Anfang an (Hatz 2007).

Die Erkrankung tritt am häufigsten zwischen dem 25. und dem 50. Lebensjahr auf, wobei Frauen etwa 3 mal häufiger betroffen sind als Männer. Rund 1 % der Bevölkerung, darunter etwa 4 – 7 % Kinder bis zum 16. Lebensjahr, leidet an RA, die damit die häufigste entzündliche Gelenkerkrankung ist (Hettenkofer 2003, Puchner 2010).

Die eigentliche Krankheitsursache ist unbekannt, eine genetische Disposition gilt als gesichert, da rund 70 % der Erkrankten Träger des HLA-DR4-Antigen-Allels sind. Man geht von einer Störung der Immunantwort auf eine vorausgegangene virale oder bakterielle Infektion aus, die zum Teil unerkannt ablaufen kann. Dabei werden unter anderem die proinflammatorischen Zytokine $\text{TNF-}\alpha$ und IL-1 gebildet, wobei vor allem $\text{TNF-}\alpha$ als Haupttrigger für die Immunreaktion gilt. Für den Ablauf der Immunantwort wird folgende Theorie zugrunde gelegt (Abb. 1; nach (Hettenkofer 2003, Hatz 2007).

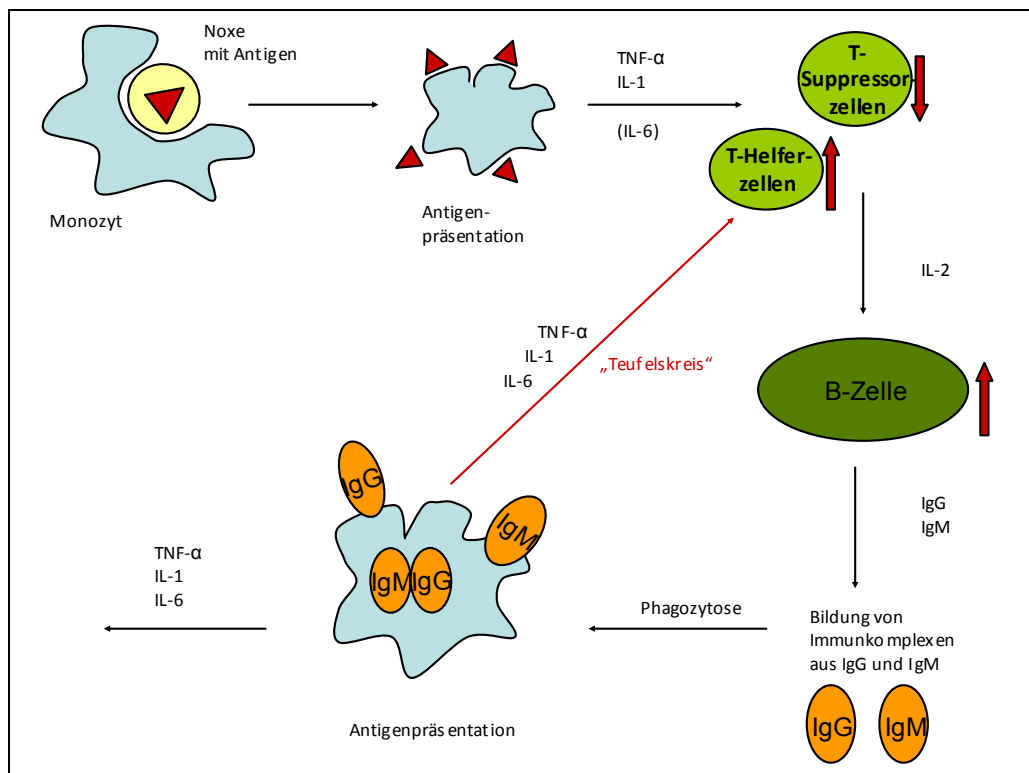


Abbildung 1: Pathophysiologie der RA (nach Hatz 2007 und Hettenkofer 2003)

Eine unbekannte Noxe (Bakterien, Viren, Autoantigen) wird durch Monozyten phagozytiert und es kommt zur Antigenpräsentation. Dies führt zur Freisetzung von $\text{TNF-}\alpha$ und IL-1, wodurch die entzündliche Reaktion (z. B. in der Gelenkkapsel) ausgelöst wird. Infolge dessen reduziert sich die Zahl der T-Suppressorzellen, während die T-Helferzellen-Anzahl steigt.

Diese schütten IL-2 aus und aktivieren so B-Zellen, welche verstärkt Autoantikörper wie IgG und IgM produzieren. Diese können sich zu Immunkomplexen zusammenlagern, die sich zum Beispiel in der Synovialmembran oder den Blutgefäßen festsetzen. Dort werden die Immunkomplexe erneut phagozytiert und präsentiert, was zu einer zusätzlichen Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie IL-1 und IL-6 führt, die neben den freigesetzten O₂-Radikalen und Kollagenasen entscheidend für die Knorpelzerstörung und Knochenerosionen sind. Durch eine genetisch bedingte T-Zell-Suppressorinsuffizienz und eine verminderte Anzahl zytotoxischer T-Zellen wird die überschießende Immunantwort nicht mehr gestoppt, so dass sich die Entzündung verselbstständigt und ein „Teufelskreis“ entsteht (Hatz 2007, Hettenkofer 2003).

1.1.1.1. Therapie der rheumatoiden Arthritis

Ziel der Therapie der rheumatoiden Arthritis ist es, Symptome wie Schmerzen und Entzündung zu beseitigen oder zu lindern und die Erkrankung zur Remission zu bringen bzw. eine möglichst niedrige Krankheitsaktivität zu erzielen.

Um Schmerzen und Entzündung zu reduzieren, werden hauptsächlich nicht-steroidale Antirheumatika (NSAR) wie Ibuprofen, Diclofenac und Naproxen sowie die COX-2-Hemmer Celecoxib und Etoricoxib eingesetzt. Die Anwendung von Opioidanalgetika stellt die Ausnahme dar.

Eine Remission der RA lässt sich zu Beginn der Erkrankung häufiger erreichen als in späteren Phasen, weshalb für die Therapie ein früher Behandlungsbeginn wichtig ist („jeder Monat zählt“). Deshalb sollten so viele Patienten wie möglich umgehend nach Diagnosestellung mit Disease modifying antirheumatic drugs (DMARD) behandelt werden mit dem Ziel, eine Remission oder niedrige Krankheitsaktivität so schnell wie möglich innerhalb von 3 bis maximal 6 Monaten zu erreichen. Solange dieses Ziel nicht erreicht ist, ist eine kontinuierliche Anpassung der Therapie nötig (S1-Leitlinien der DGRh zur sequenziellen (DGRh 2012) medikamentösen Therapie der rheumatoiden Arthritis 2012 (DGRh 2012).

Als Mittel der ersten Wahl in der Behandlung der RA gilt weltweit Methotrexat (MTX), das initial in Kombination mit Prednisolon verwendet wird. In Ausnahmefällen kann die Ersttherapie auch mit einer Kombination aus MTX mit einem Biologikum durchgeführt werden (DGRh 2012). Biologika sind monoklonale Antikörper, die gegen

proinflammatorische Zytokine oder Oberflächenproteine gerichtet sind und deren Wirkung blockieren oder neutralisieren. Zur Behandlung rheumatischer Erkrankungen werden Antikörper gegen die Zytokine TNF- α , IL-1 und IL-6 sowie gegen die Oberflächenmoleküle CD20 (Oberflächenmolekül der B-Zellen) und CTLA-4 (Oberflächenmolekül der T-Helferzellen) verwendet (Puchner 2010).

Kann MTX aufgrund von Kontraindikationen oder Unverträglichkeiten nicht zum Einsatz kommen, sollte die Therapie mit anderen DMARD, wie zum Beispiel Leflunomid (LEF) oder Sulfasalazin (SSZ) begonnen werden (Abb. 2). Antimalariamittel (Hydroxychloroquin (HCQ) und Chloroquin) werden heute nur bei sehr mild verlaufender RA empfohlen.

Nach S1-Leitlinie werden Glukokortikoide initial in niedriger bis mittlerer Dosierung als Ergänzung zu DMARD verabreicht, dann jedoch rasch reduziert und möglichst niedrig dosiert (DGRh 2012).

Wird das Therapieziel trotz optimierter Monotherapie mit einem DMARD nicht erreicht, kann eine Kombination mehrerer DMARD, evtl. auch mit einem Biologikum, erwogen werden. Ist auch eine Kombination aus zwei DMARD unwirksam, wird auf jeden Fall eine Biologikatherapie empfohlen, die primär als Monotherapie durchgeführt werden sollte, bei Nichtansprechen jedoch auch in Kombination mit einem weiteren Biologikum (S1-Leitlinie, Abb. 2).

Bei therapierefraktärer RA sollte der Einsatz weiterer DMARD und immunmodulierender Therapien erwogen werden. Dazu gehört neben parenteralem Gold, Ciclosporin A und Cyclophosphamid auch Azathioprin, das gerade bei schwer zu beeinflussenden Formen der RA eine gute Wirksamkeit zeigt (DGRh 2012).

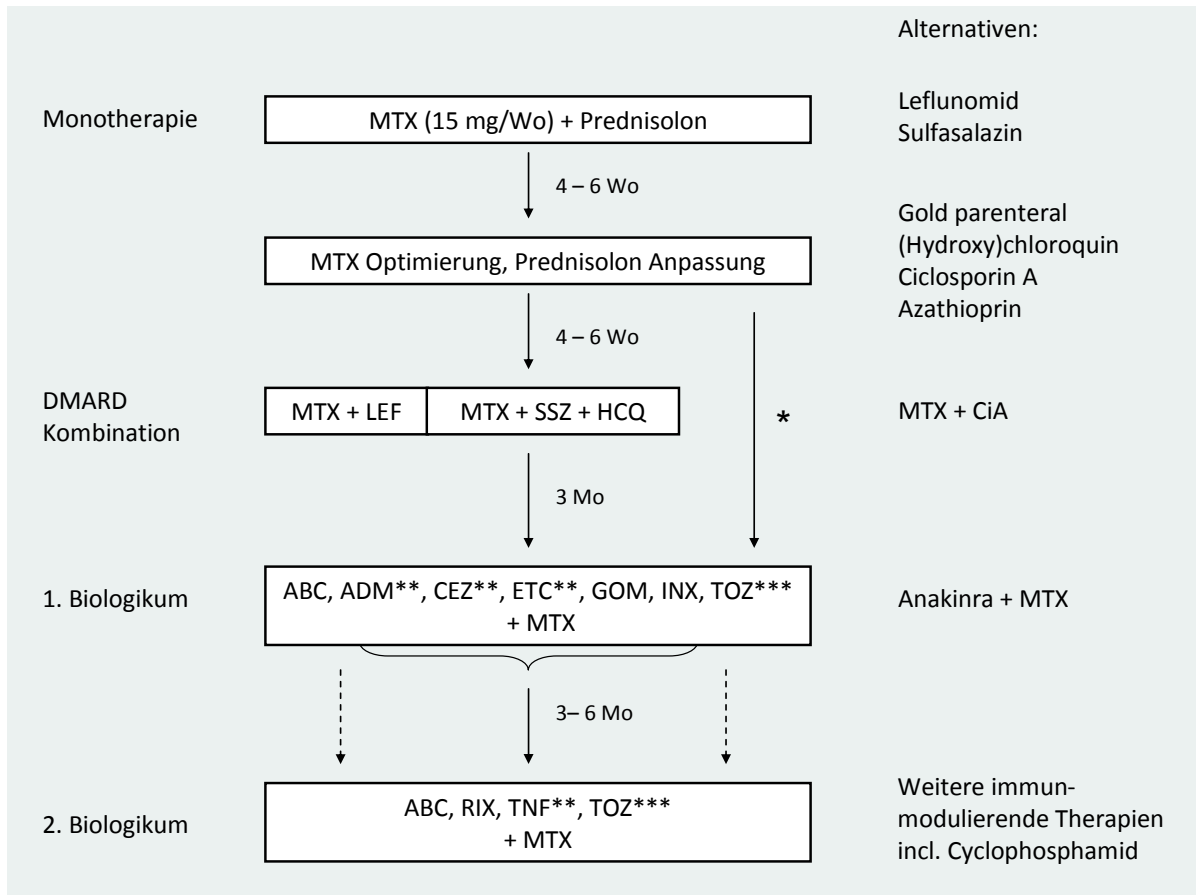


Abbildung 2: Therapiealgorithmus für die rheumatoide Arthritis (DGRh 2012)

*Vorliegen hoher Krankheitsaktivität, insbesondere mit ungünstigen Prognosefaktoren

**ADM, CEZ, ETC sind auch für die Monotherapie zugelassen, wenn MTX nicht einsetzbar ist

***TOZ ist auch für die Monotherapie zugelassen, wenn MTX nicht einsetzbar ist, und hat sich in Studien als gleich effektiv in Monotherapie und Kombination mit MTX erwiesen

1.1.2. Systemischer Lupus erythematoses (SLE)

Der systemische Lupus erythematoses gehört in die Gruppe der Kollagenosen und gilt als entzündliche systemische Bindegewbserkrankung, ebenfalls mit gestörter Immunregulation. Er kann verschiedene Organsysteme erfassen. Häufigstes Symptom zu Beginn ist Fieber, meist gefolgt von einer unklaren Gewichtsabnahme und myalgischen Beschwerden. Im weiteren Verlauf sind Arthritis, Photosensibilität und Hautmanifestationen (z. B. das schmetterlingsförmige Lupuserythem im Gesicht, von dem die Erkrankung ihren Namen erhalten hat) oft vorkommende Erscheinungsformen. Renale (Lupus-Nephritis), hämatologische (Anämie, Leukopenie, Thrombozytopenie) und neurologische Beteiligungen

verschlechtern die Prognose ebenso wie vermehrt auftretende Infektionen und eine früh einsetzende Arteriosklerose. Dank einer früheren Diagnose und gezielteren Therapie hat sich die Prognose in den letzten Jahren deutlich verbessert, die 10 Jahres-Überlebensrate beträgt inzwischen 85 - 90 % (Puchner 2010).

SLE tritt oft zwischen dem 25. – 35. Lebensjahr auf, es können jedoch auch Kinder erkranken. Frauen erkranken etwa 9 – 10 mal häufiger als Männer, die schwarze Bevölkerung ist etwa 3 mal häufiger betroffen. Die Ursache für die Erkrankung ist bisher nicht bekannt, eine genetische Disposition wird vermutet. Starke Sonneneinstrahlung in den Sommermonaten kann eine Neuerkrankung oder einen akuten Schub auslösen. Außerdem wurde beobachtet, dass die Erkrankung nach der Menopause rückläufig ist, was darauf hindeutet, dass auch hormonelle Faktoren von Bedeutung sind (Hatz 2007, Hettenkofer 2003, Puchner 2010).

Typisch für den SLE ist das Vorkommen von zahlreichen Autoantikörpern, wie zum Beispiel Antikörper gegen Zellkernsubstanzen (ANF), insbesondere gegen native Doppelstrang-DNA (dsDNA). Ein weiteres Merkmal für den SLE ist die Immunkomplexbildung mit Ablagerungen in unterschiedlichen Geweben (Hettenkofer 2003).

1.1.2.1. Therapie des Systemischen Lupus erythematodes

Zur Therapie des SLE gehört eine medikamentöse, der Krankheitsaktivität angepasste Behandlung, aber auch die Vermeidung schubauslösender Faktoren, wie z. B. UV-Strahlung, Infektionen, Medikamente und Stress (Puchner 2010).

In der symptomatischen Therapie von Arthralgien und Myalgien leisten NSAR gute Dienste, zur Basistherapie bei Gelenkbeschwerden und Hautbeteiligung werden Antimalariamittel wie Chloroquin und Hydroxychloroquin eingesetzt.

Steroide sind in der Behandlung des SLE unverzichtbar und werden in akuten Schubsituationen kurzfristig hoch dosiert (bis zu 1 mg/kg KG/d) verabreicht, bei längerer Anwendung jedoch sollte eine Dosis von 7,5 bis 10 mg Prednisolon pro Tag nicht überschritten werden (Hettenkofer 2003, Puchner 2010).

Besteht die Aktivität trotz der Therapie mit Antimalariamitteln weiter oder liegt der Steroidbedarf über 7,5 mg/d und / oder liegt eine Organbeteiligung vor, ist die Indikation für eine immunsuppressive Therapie gegeben. Mittel der ersten Wahl ist Azathioprin, aber auch Methotrexat kommt zum Einsatz.

Besteht eine aktive ZNS-Beteiligung oder Glomerulonephritis, wird meist mit Cyclophosphamid behandelt. Nach einem Behandlungszyklus mit Cyclophosphamid oder bei weniger schweren Organmanifestationen kann die Therapie mit Mycophenolat-Mofetil (MMF) fortgesetzt werden (Puchner 2010).

In bedrohlichen Situationen wird zur Elimination der Immunkomplexe eine Plasmaaustauschbehandlung durchgeführt (Hettenkofer 2003).

1.2. Azathioprin

1.2.1. Dosierung

In den Fachinformationen (FI) für Azathioprin (hier am Beispiel der FI von Imurek® der Firma GlaxoSmithKline dargestellt, die die Substanz als erste auf den Markt gebracht haben) wird empfohlen, Azathioprin zur Behandlung von rheumatischen Erkrankungen initial mit einer Dosierung von etwa 1 mg/kg Körpergewicht zu beginnen, um die Dosis bei Bedarf nach 6 - 8 Wochen zu steigern. Weitere Dosiserhöhungen können in einem Abstand von 4 Wochen erfolgen, falls noch kein ausreichender Effekt festgestellt wird und gute Verträglichkeit besteht. Die Dosis sollte 3 mg/kg KG nicht überschreiten und bei Ansprechen auf die Therapie die niedrigste wirksame Dosis angewendet werden. Ein Effekt tritt meist nach 6 – 8 Wochen, spätestens jedoch nach 12 Wochen ein. Ist nach 3 - 6 monatiger Behandlung keine Besserung zu erkennen, sollte Azathioprin abgesetzt werden (GlaxoSmithKline 2007).

1.2.2. Pharmakokinetik

Azathioprin (Abb. 3) ist ein Nitroimidazolderivat und das Prodrug von 6-Mercaptopurin (6-MP) (7H-Purin-6-thiol; $C_5H_4N_4S$; $M=152,2$) (Abb. 4). Seine chemische Bezeichnung lautet 6-(1-Methyl-4-nitro-5-imidazolyl)-Mercaptopurin ($C_9H_7N_7O_2S$; $M = 277,3$).

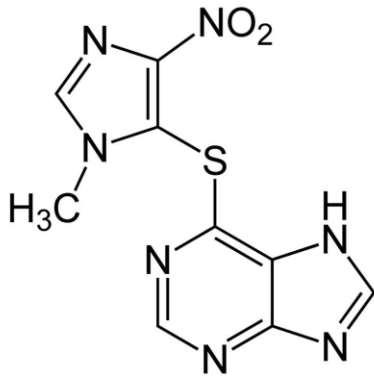


Abbildung 3: Strukturformel Azathioprin

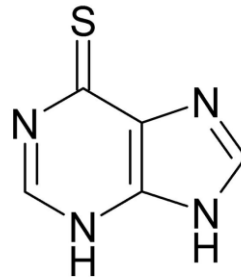


Abbildung 4: Strukturformel 6-MP

1.2.2.1. Absorption, Verteilung, Ausscheidung

Azathioprin

Nach oraler Einnahme wird Azathioprin gut und vollständig aus dem Darm resorbiert. Maximale Plasmakonzentrationen sind 1 bis 2 Stunden nach der Einnahme erreicht. Im Anschluss an die Resorption findet rasch der glutathionabhängige Abbau zu 6-MP und Mercaptoimidazol (1-Methyl-4-nitro-4-thioimidazol) statt.

Nach intravenöser Gabe beträgt die Plasmahalbwertszeit von Azathioprin 3 bis 5 Stunden, lediglich 30 % der Substanz werden an Plasmaproteine gebunden. Die Metaboliten von Azathioprin sind liquorgängig (GlaxoSmithKline 2007, Elion 1972). Mit Hilfe der Bestimmung von 6-MP wird die orale Bioverfügbarkeit von Azathioprin zwischen 27 – 83 % geschätzt. Blutspiegel von Azathioprin selbst sind nach oraler Applikation wegen der sofort stattfindenden und von Glutathion abhängigen Umwandlung in 6-MP nicht messbar (Sahasranaman et al. 2008).

Maximal 2 % der Gesamtdosis werden mit dem Urin in unveränderter Form ausgeschieden, bis zu 50 % der Dosis erscheinen dagegen als Metaboliten innerhalb von 24 Stunden im Urin. Nur 12 % der eingenommenen Menge kann man innerhalb von 48 Stunden in den Fäzes finden (Elion 1967, Bach und Dardenne 1971, GlaxoSmithKline 2007).

Es gibt keinen Hinweis auf einen enterohepatischen Kreislauf. Bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion kann eine Dosisreduktion notwendig sein, da die Ausscheidung der aktiven Metaboliten reduziert ist (GlaxoSmithKline 2007).

6-Mercaptopurin

Das nach nicht-enzymatischer Spaltung durch Glutathion entstandene 6-MP wird rasch im Körper verteilt. Nach oraler Gabe von 6-MP beträgt die Halbwertszeit 0,5 – 1 Stunde, die Plasmaproteinbindung liegt bei 20 %. Nach oraler Gabe von 6-MP werden 42 % der Substanz renal ausgeschieden (unverändert und als Metaboliten), 22 % findet man in den Fäzes (Elion 1972).

1.2.2.2. Metabolismus

Azathioprin ist das Prodrug von 6-MP und wird in den Erythrozyten noch vor der ersten Leber-Passage durch nicht-enzymatische und glutathionabhängige Abspaltung des Imidazolylringes direkt in 6-MP und Mercaptoimidazol umgewandelt. Anschließend erfolgt unter anderem die Metabolisierung in 6-Thioguaninnukleotide (6-TGN), die antiproliferativ und immunsuppressiv wirken. Die 6-TGN sollen jedoch auch für die toxischen Wirkungen von Azathioprin verantwortlich sein. Der Metabolismus von Azathioprin bis zu den 6-TGN ist relativ komplex und soll im Folgenden näher erläutert werden.

Nach der Spaltung von Azathioprin zu 6-MP verläuft die weitere Metabolisierung auf drei miteinander konkurrierenden Pfaden über die Enzyme Thiopurin-S-Methyltransferase (TPMT), Xanthinoxidase (XO) und Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT). Auf dem ersten Pfad wird 6-MP mittels Thiopurin-S-Methyltransferase (TPMT), die sich in der Darmmukosa, der Leber und den Erythrozyten befindet, zu dem unwirksamen Metaboliten 6-Methylmercaptopurin (6-MMP) abgebaut, während in einer dazu parallel ablaufenden zweiten Reaktion, die durch die Xanthinoxidase (XO) katalysiert wird, Thioharnsäure entsteht (Thiouric Acid, TU). Auch TU ist ein inaktiver Metabolit (Abb. 5).

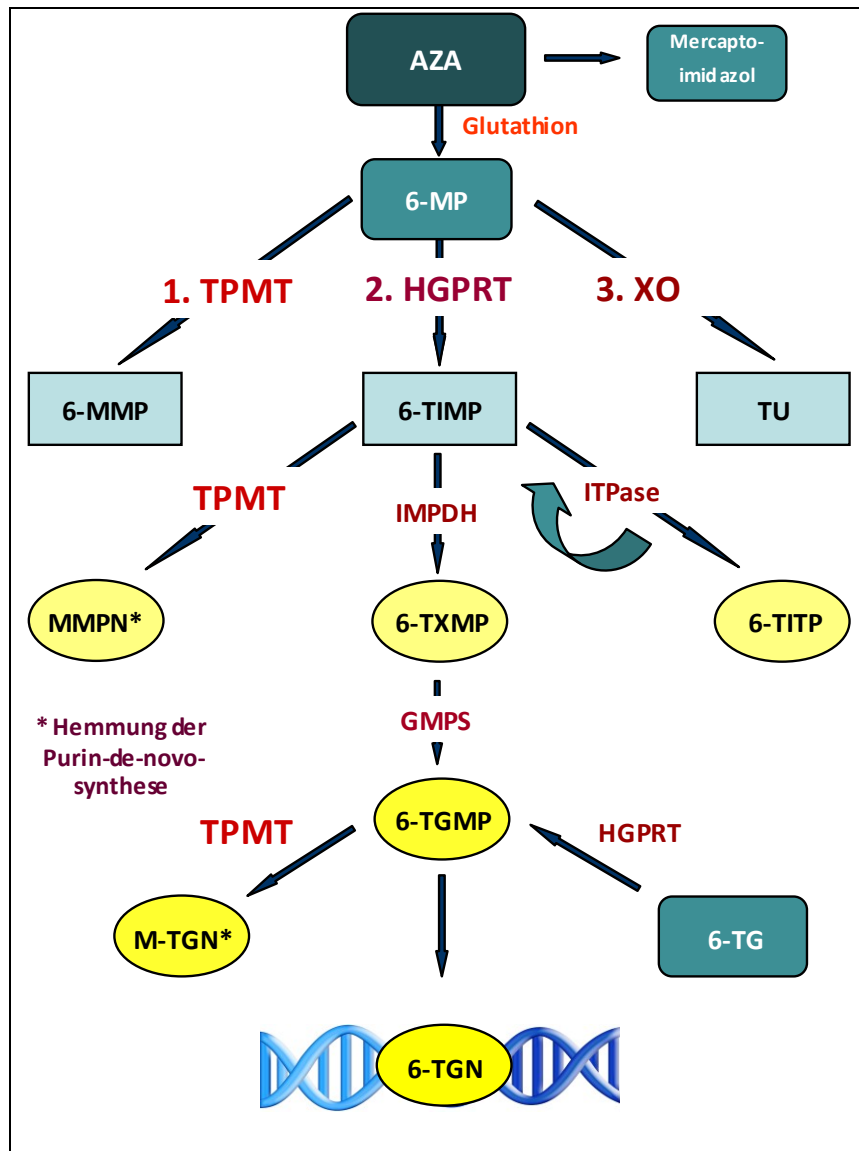


Abbildung 5: Metabolismus von Azathioprin bzw. 6-MP (nach Berg und Ford 2010 sowie (Sahasranaman et al. 2008))

Die aktiven 6-Thioguaninnukleotide (6-TGN) entstehen dagegen auf dem konkurrierenden dritten Pfad, auf dem 6-MP durch das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT) zu Thioinosin-5-monophosphat (6-TIMP), das man auch als Thioinosinsäure bezeichnet, metabolisiert wird. 6-TIMP wird dann über die Zwischenstufen Thioxanthosin-5-monophosphat (TXMP) und Thioguanosin-5-monophosphat (TGMP) zu den 6-Thioguaninnukleotiden (6-TGN) umgewandelt. Der Abbau von 6-TIMP in 6-TXMP wird katalysiert durch die Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase (IMPDH), die Umwandlung von 6-TXMP zu 6-TGMP durch die Guanosin-Monophosphat-Synthetase (GMPS). 6-TGMP wiederum wird über eine Reihe von Kinasen und Reduktasen letztendlich zu den 6-TGN

metabolisiert (Coulthard et al. 2002) (Abb. 5). Diese können nun ihre Wirkung durch Einbau in die DNA entfalten. Gleichzeitig stehen die 6-TGN aber auch im Verdacht, einige dosisabhängige UAWs zu verursachen, allen voran die Myelotoxizität (Gearry et al. 2003).

6-TIMP, welches durch Abbau durch die HGPRT entstanden ist, wird außer zu 6-TGN auch noch mit Hilfe der TPMT zu Methyl-mercapto-purin-nukleotiden (MMPR) umgewandelt (Abb. 5). Diese stehen ebenfalls im Verdacht, zur Thiopurintoxizität beizutragen, indem sie die Purinbiosynthese hemmen (de Boer et al. 2007).

Parallel dazu kann TIMP auch noch zu Thio-Inosin-Triphosphat (6-TITP) phosphoryliert werden, das wiederum mit Hilfe der Inosin-Triphosphat-Pyrophosphohydrolase (ITPase) zurück in 6-TIMP verwandelt wird (Abb. 5). Ein Mangel an ITPase führt zur Akkumulation von 6-TITP, das ebenso toxische Effekte zeigt und für grippeähnliche Symptome, Pankreatitis und Exanthembildung verantwortlich gemacht wird (Berg und Ford 2010, Chevaux et al. 2010, de Boer et al. 2007).

TGMP, das nach Abbau von 6-MP mittels HGPRT, IMPDH und GMPS entsteht, kann außer zu 6-TGN auch noch zu Methylthioguaninnukleotiden (M-TGN) metabolisiert werden, auch hier ist das katalysierende Enzym wieder die TPMT (Abb. 5). Auch die M-TGN inhibieren die Purinbiosynthese und können so zur Toxizität von Azathioprin und 6-MP beitragen. Die klinische Bedeutung dieses Weges ist jedoch noch unklar.

Ein relevanter klinischer Effekt von Azathioprin ist oft erst nach 4 - 6 Monaten zu beobachten, da sich die aktiven 6-TGN in den Erythrozyten anreichern müssen, um eine Wirkung zu erzielen und dies einige Wochen dauern kann. Die Halbwertszeit der 6-TGN in den Erythrozyten ist lang und variiert mit 3 - 13 Tagen stark (de Boer et al. 2007, Shipkova und Ahsen 2003). Durch diese lange Halbwertszeit erklärt sich auch die verlängerte Wirksamkeit von Azathioprin, die noch Tage über das Absetzen hinaus anhält.

Die unerwünschten Wirkungen können jedoch schon vor Einsetzen des therapeutischen Effekts auftreten, was zu einem frühzeitigen Abbruch der Therapie führt.

1.2.3. Wirkmechanismus

Azathioprin bzw. seine Metaboliten können an unterschiedlichen Stellen des Immunsystems angreifen und so ihren immunsupprimierenden Effekt entfalten. Die verschiedenen Wirkmechanismen sollen nun kurz dargestellt werden.

1.2.3.1. Hemmung der Purinbiosynthese

Ein Angriffspunkt der Azathioprinmetaboliten ist die Purinbiosynthese, die durch kompetitive Hemmung gestört wird. So blockiert 6-Thioinosinsäure (6-TIMP), die während des Abbaus von 6-MP entsteht (Abb. 5), die Phosphoribosyl-Diphosphat-Amidotransferase, (PRPP – Amidotransferase), die den ersten Schritt der Purinbiosynthese katalysiert. Dadurch wird die Bildung von 5 - Phosphoribosylamin verhindert. Zusätzlich werden die Adenylsuccinat-Synthetase und die IMP-Dehydrogenase gehemmt, die die Bildung von Adenosin-5-monophosphat (AMP) bzw. Guanosin-5-monophosphat (GMP) katalysieren. Durch diese Enzymhemmung stehen die Purine AMP (bzw. ATP) und GMP (bzw. GTP) nicht mehr zur Bildung von Nukleinsäuren und damit auch nicht zur Bildung von DNA und RNA zur Verfügung (Daczo 2007, Karlson 2005) (Abb. 6).

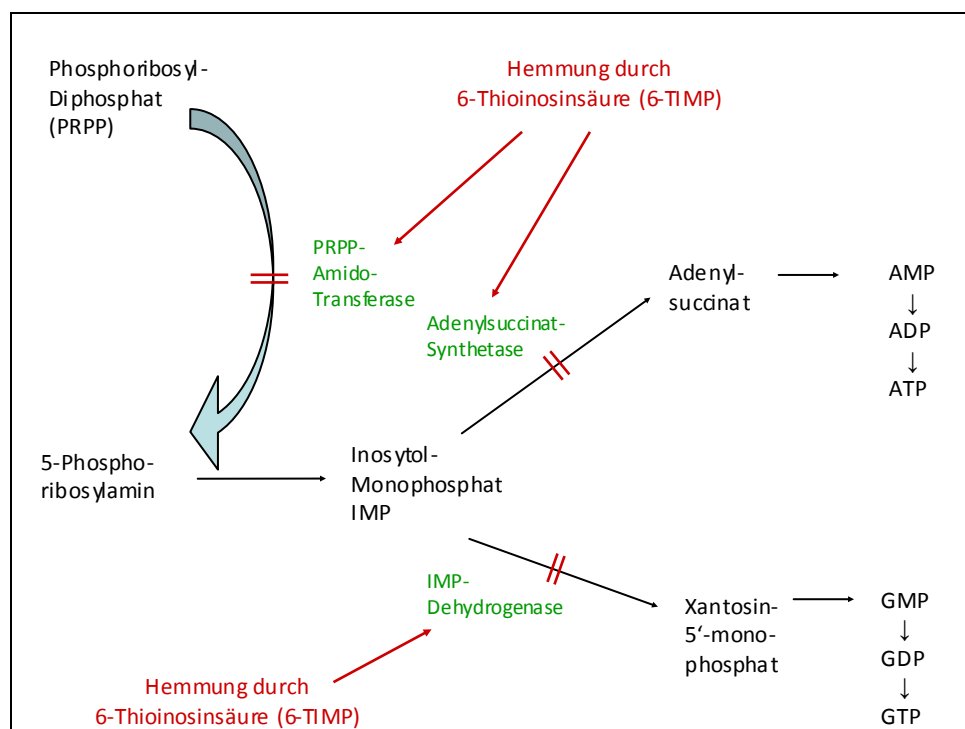


Abbildung 6: Hemmung der Purinbiosynthese (nach Daczo 2007 und Karlson 2005)

Zusätzlich wirken 6-TGN zu etwa 30 % als Antimetabolite, die durch den Einbau in DNA und RNA, durch Strangbrüche und Hemmung des Reparaturmechanismus die Genaktivierung, Zellproliferation, Nukleotid- und Proteinsynthese stören und damit auch die Proliferation der Lymphozyten hemmen (Berg und Ford 2010, de Boer et al. 2007). Die Zytotoxizität ist

abhängig vom Zellzyklus und findet nur in der S-Phase statt, was den verzögerten Wirkungseintritt, aber auch die verzögerte Zytotoxizität erklären könnte (Sahasranaman et al. 2008). Da gerade bei entzündlichen Prozessen und Tumoren eine hohe Proliferationsrate der Lymphozyten vorliegt, wird so hauptsächlich die Vermehrung dieser Zellen gehemmt.

Beim Abbau von 6-MP entsteht durch den Abbau über die TPMT auch 6-MMPN (Abb. 5), das genauso wie 6-TGN ein starker Inhibitor der Purinbiosynthese ist und so ebenfalls die Proliferation von Lymphozyten hemmt (Elion 1989).

1.2.3.2. Erhöhung der Apoptoserate

Ein weiterer Mechanismus ist die Erhöhung der Apoptoserate aktivierter T-Lymphozyten durch den Eingriff in den Rac-1-Signalweg.

Um eine Immunantwort zu erhalten, müssen naive T-Lymphozyten zuerst aktiviert werden. Dazu sind zwei Signale gleichzeitig nötig. Dies ist zum einen der Kontakt mit einer antigen-präsentierenden Zelle (APC), um zu erkennen, gegen welches Antigen sich die Immunantwort richten soll. Um diesen Kontakt zu verstärken, ist zum anderen die Bindung von CD 28 auf der APC nötig. CD 28 initiiert nicht nur die T-Zellaktivierung, es hält die immunologische Reaktion auch weiterhin in Gang. Da jedoch eine unkontrollierte T-Zell-Proliferation das Risiko für eine chronische Entzündung deutlich erhöht, ist eine gute Kontrolle dieser Proliferation durch das Immunsystem nötig. Dies geschieht mit Hilfe der Apoptose, die aktivierte T-Lymphozyten zur Selbstzerstörung veranlasst (Atreya 2005). Azathioprin bzw. seine Metaboliten können die Apoptose von T-Lymphozyten induzieren und so entscheidend in das Entzündungsgeschehen eingreifen (Abb. 7).

Der Azathioprin-Metabolit 6-Thio-GTP bewirkt über eine Hemmung der Rac-Aktivierung durch Bindung an Rac-GTPase eine Blockade der CD 28 vermittelten intrazellulären Signalkaskade. Rac-1 ist ein Enzym, das sowohl für die NF- κ B- als auch für die Stat-3-Aktivierung eine wichtige Rolle spielt und letztendlich über die vermehrte Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-x_L auch ein antiapoptotisches Signal liefert. Azathioprin führt zu einer geringeren Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und Stat-3 und somit zu einer verminderten Expression von Bcl-x_L. Das ursprünglich anti-apoptotische Signal der CD 28 vermittelten Co-Stimulation wird durch Azathioprin in ein apoptotisches Signal umgewandelt (Atreya 2005).

6-Thio-GTP kann also durch die Bindung an Rac-1 die Apoptoserate der T-Zellen steigern und übt damit einen hemmenden Effekt auf die Antikörpersynthese vor allem der zellulären Immunabwehr aus.

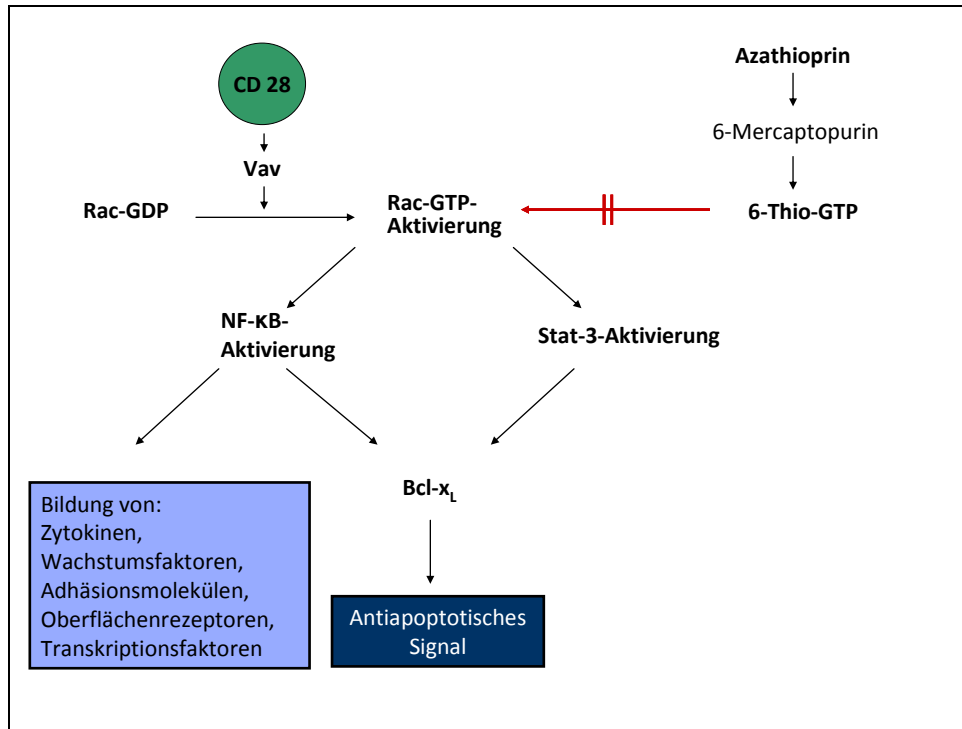


Abbildung 7: Apoptoseinduktion durch Azathioprin (nach Atreya 2005)

Für die Apoptoseinduktion ist es entscheidend, dass die T-Lymphozyten durch eine vorausgegangene CD 28-vermittelte Co-Stimulation aktiviert wurden, da T-Zellen, die nicht aktiviert wurden, auch nicht zur Apoptose angeregt werden können. Da niemals alle Zellen gleichzeitig aktiviert sind, kommt es im Rahmen einer Azathioprintherapie nicht zu einer kompletten T-Zell-Depletion und der Patient bleibt noch teilweise immunkompetent. Interessant ist hierbei, dass die Apoptoseinduktion erst nach einer relativ langen Zeitspanne eintritt, was sich auch in der Tatsache widerspiegelt, dass zwischen dem Beginn der Azathioprintherapie und einem klinischen Erfolg mehrere Wochen vergehen. Dies scheint daran zu liegen, dass in den aktivierten T-Zellen relativ hohe 6-Thio-GTP-Spiegel erreicht werden müssen, da 6-Thio-GTP nur eine geringe Affinität zu Rac-1 zu haben scheint (Atreya 2005). Weil Azathioprin bzw. 6-MP parallel durch die drei Enzyme XO, HPRT und TPMT abgebaut wird, jedoch nur beim Abbau über HPRT 6-Thio-GTP entsteht, kann es einige Zeit dauern, bis eine ausreichende Menge an 6-Thio-GTP gebildet wurde.

Weiterhin spielen Rac-Proteine eine wichtige Rolle bei der Entwicklung, Differenzierung und Proliferation von T-Zellen und damit bei der Aufrechterhaltung des Entzündungsgeschehens. Durch Hemmung der Rac-1-Aktivierung wird auch die Aktivierung von NF- κ B inhibiert (Abb. 7), das in den T-Zellen nicht nur für die Bcl-Expression verantwortlich ist, sondern auch noch viele weitere Transkriptionen reguliert, wie die Bildung verschiedener Zytokine (z.B. Interleukin 2, 6, 8 und 12 p40, TNF- α und Interferon- β), Wachstumsfaktoren (GN-CSF), Adhäsionsmoleküle (ELAM-1, VCAM-1, ICAM-1, E-Selektin, Mad-CAM-1), Oberflächenrezeptoren (Teile des T-Zell-Rezeptors, β_2 -Mikroglobulin, Teile des IL-2-Rezeptors) und anderer Transkriptionsfaktoren (c-rel, c-myc, IRF-1, I κ B α). Hemmt man nun die Bildung von NF- κ B, greift man automatisch an vielen weiteren Punkten in die Immunreaktion ein und kann diese „modulieren“.

1.2.3.3. Hemmung der Genexpression

Neben den oben genannten Eigenschaften kann Azathioprin in aktivierten Lymphozyten auch selektiv die Expression einiger Gene inhibieren. Dazu gehören α -4-Integrin, TNFR SF 7 (CD 27) und TRAIL (Daczo 2007) (Abb. 8).

α -4-Integrin findet man in den Plasmamembranen von Zellen, häufig bei aktivierten Lympho- und Monozyten. Dort dient es als Rezeptor und reguliert die Migration der Zellen an den Entzündungsort (Daczo 2007, von Andrian und Engelhardt 2003). Inhibiert man die Expression von α -4-Integrin, so können die Zellen nicht zum Entzündungsort wandern und die Entzündungskaskade wird unterbrochen.

TNFR SF 7 (CD 27), das zur TNF-Familie gehört, verstärkt die Aktivierung von T-Lymphozyten, indem es CD 70 aktiviert (Daczo 2007, Yamamoto et al. 1998). Wird es nicht exprimiert, werden auch die T-Lymphozyten nicht oder weniger aktiviert.

TRAIL ist ein Membranprotein, das von NK-Zellen und zytotoxischen T-Lymphozyten auf der Zelloberfläche exprimiert wird. TRAIL bewirkt eine Lymphozytenproliferation und die Sekretion von Interferon-gamma. Durch die Hemmung der TRAIL-Expression durch 6-TGN kann ein Überschießen der Immunreaktion gehemmt werden (Daczo 2007, Chou et al. 2001).

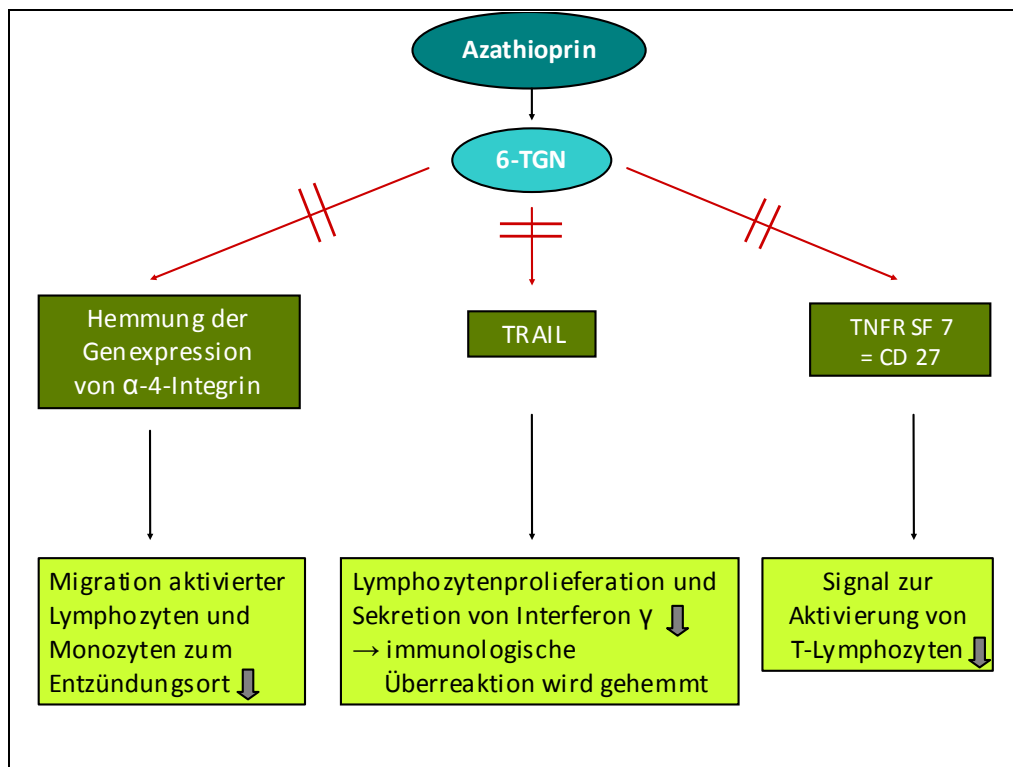


Abbildung 8: Hemmung der Genexpression

1.2.3.4. Weitere Effekte

Azathioprin wirkt auf NK-Zellen, B-Lymphozyten und Rheumafaktoren antiproliferativ und senkt die Sekretion von TNF- α durch die Hemmung mehrerer Stufen der Nukleinsäuresynthese (GlaxoSmithKline 2007). Außerdem scheint es SH-Gruppen durch Alkylierung zu blockieren und so die Zytokinsynthese und den Austritt von polymorphkernigen Leukozyten aus dem Blut in das Gewebe zu verhindern. Azathioprin besitzt auch eine unspezifische antiphlogistische Wirkung durch die Hemmung der Prolinhydroxylase und der Sulfatinkorporation in saure Mukopolysaccharide (Leuschner 2006).

1.2.4. Unerwünschte Wirkungen

Trotz der guten Wirksamkeit von Azathioprin kommt es bei ca. 10 – 15 % der Patienten zu unerwünschten Arzneimittelwirkungen, unabhängig von der Grunderkrankung (Schwab et al.

2003, Colombel et al. 2000, Chevaux et al. 2010). Diese Nebenwirkungen führen relativ häufig zum Therapieabbruch.

Die auftretenden UAW lassen sich in dosisunabhängige (allergisch) und dosisabhängige einteilen. Zu den dosisunabhängigen zählen Übelkeit und Erbrechen, Exantheme, Niedergeschlagenheit, Fieber und Pankreatitis (meist nach Nierentransplantationen oder bei vorbestehenden entzündlichen Darmerkrankungen). Allergische Reaktionen treten bei rund 5 – 11 % der Patienten auf und bilden sich nach Absetzen von Azathioprin vollständig zurück. Ein Teil der Patienten mit CED kann mit 6-MP weiter therapiert werden. Man geht davon aus, dass der Imidazolrest von Azathioprin die allergische Reaktion auslöst (McGovern et al. 2002). Häufig ist eine Verschlechterung der Leberfunktionswerte zu beobachten, die meistens dosisabhängig ist. Die Leberzellschädigung wird evtl. durch 6-MMP verursacht, das durch den Abbau von 6-MP über die TPMT entsteht (Abb. 5). Da die TPMT auch in der Leber vorhanden ist, kann es bei verstärkter Aktivität zu einer hohen Konzentration von 6-MMP kommen, was dann zu einer Leberzellschädigung führt (Dubinsky et al. 2002, Daczo 2007, Dubinsky et al. 2000, Tapner et al. 2004).

Zu den dosisabhängigen UAW zählen Leukopenien, Knochenmarkdepressionen sowie Anämien und die damit einhergehende erhöhte Infektionsgefahr. Leukopenien können zu jedem Zeitpunkt der Behandlung auftreten, sie können plötzlich einsetzen, sich aber auch langsam entwickeln und für den Patienten potenziell lebensbedrohlich sein. Etwa 17 % der Patienten entwickeln im Verlauf der Therapie eine Leukopenie, die Häufigkeit ist abhängig von den Grenzwerten, durch die eine Leukopenie definiert wird und die zwischen $<2000/\mu\text{l}$ bzw. $<4000/\mu\text{l}$ schwanken (Clunie und Lennard 2004, Whisnant und Pelkey 1982). Tritt eine Leukopenie auf, muss meistens die Azathioprin-dosis reduziert oder die Therapie beendet werden.

Selten können unter einer Azathioprintherapie auch bösartige Erkrankungen auftreten, wie z. B. Non-Hodgkin-Lymphome, Melanome oder Sarkome; ein Zusammenhang ist jedoch nicht bewiesen. Bei der RA tritt zum Beispiel bereits krankheitsbedingt eine höhere Rate an Tumoren auf, ein kausaler Zusammenhang mit Azathioprin ist dann schwer nachzuweisen. Zusammenfassend kann man sagen, dass die wichtigsten Gründe zum Therapieabbruch zu Leukopenien, Pankreatitiden, Leberfunktionserhöhungen und gastrointestinale Beschwerden sowie zum anderen die Unwirksamkeit der Therapie sind.

Die am meisten gefürchtete Nebenwirkung ist jedoch die Leukopenie, da sie im schlimmsten Fall auch zum Tode führen kann.

1.2.5. Wechselwirkungen

Die Komedikation kann die Pharmakokinetik von Azathioprin oder 6-MP deutlich beeinflussen. Einige dieser Interaktionen lassen sich auf die Konkurrenz um die metabolisierenden Enzyme zurückführen, andere ergeben sich aus der additiven immunsuppressiven Wirkung in Kombination mit Azathioprin oder lassen sich auf andere Effekte zurück führen.

So hemmen sowohl Allopurinol und Febuxostat sowie auch Methotrexat die XO, was bei gleichzeitiger Anwendung mit Azathioprin zu einer höheren Bioverfügbarkeit der Thiopurine (Abb. 5) und damit auch zu einer Verstärkung der pharmakologischen und toxikologischen (GlaxoSmithKline 2007, ifap 2013) Effekte führt. Während der Einfluss von Methotrexat als geringfügig eingestuft wird, gilt die Interaktion mit Allopurinol als schwerwiegend und es wird dringend empfohlen, bei peroraler Anwendung die Azathioprin- bzw. 6-MP-Dosis um bis zu 33 % zu reduzieren. Bei i. v. Applikation von Azathioprin wird der Metabolismus dagegen nicht beeinflusst, so dass keine Dosisanpassung nötig ist (Zimm et al. 1983, Coffey et al. 1972). Auch die Interaktion mit Febuxostat ist schwerwiegend, eine gleichzeitige Anwendung sollte vermieden werden (GlaxoSmithKline 2007, ifap 2013).

Sulfasalazin, Olsalazin und Mesalazin verursachen eine Hemmung der TPMT, was ebenfalls zu einer Akkumulation an Thiopurinen und damit zu einer Verstärkung der pharmakologischen und toxischen Wirkungen führen kann. Da bei gleichzeitiger Anwendung hauptsächlich eine Erhöhung des Leukopenie-, Anämie- und Panzytopenierisikos zu erwarten ist, wird eine engmaschige Kontrolle des Blutbilds empfohlen. Die Interaktion wird als mittelschwer (Mesalazin, Olsalazin) bis geringfügig (Sulfasalazin) eingeschätzt (GlaxoSmithKline 2007, ifap 2013).

Auch Ribavirin erhöht das Risiko für eine Myelosuppression, da es die IMPDH hemmt und somit eine erhöhte Konzentration an 6-TIMP (und somit auch an MMPN) verursachen kann (Abb. 5). Die Interaktion wird als mittelschwer eingestuft, eine gleichzeitige Anwendung mit Azathioprin bzw. 6-MP sollte vermieden werden. Lässt sich dies in Einzelfällen nicht vermeiden, werden engmaschige Blutbildkontrollen empfohlen (ifap 2013). Um eine additive

immunsuppressive Wirkung handelt es sich bei der Interaktion mit Prednisolon (geringfügig), Infliximab (mittelschwer) und Natalizumab (schwerwiegend). Hier erhöht sich das Risiko, eine Infektion mit opportunistischen Erregern zu erleiden (ifap 2013).

Bei einer Impfung mit Tot- und Toxoid-Impfstoffen kann der Impferfolg verringert sein, da die körpereigene Immunantwort durch die Therapie mit Azathioprin bzw. 6-MP unterdrückt wird (ifap 2013). Aus diesem Grund ist es auch möglich, dass bei der Anwendung von Lebendimpfstoffen eine Infektion mit dem Impfkern erfolgt, so dass eine solche Impfung kontraindiziert ist und frühestens 3 Monate nach Abschluss der immunsuppressiven Therapie erfolgen darf (ifap 2013).

Ebenfalls aufgrund der Immunsuppression scheint die Wirksamkeit von Brivudin beeinträchtigt zu sein. Hier sollte auf Aciclovir ausgewichen werden, da dessen Wirksamkeit auch bei immungeschwächten Patienten nachgewiesen ist (ifap 2013).

Die gleichzeitige Gabe von ACE-Hemmern kann das Risiko für die Ausbildung einer Anämie oder Leukopenie erhöhen, da ACE-Hemmer vermutlich die Erythropoietin-Synthese hemmen und die Patienten durch die Azathioprintherapie dafür sensibilisiert werden (ifap 2013).

Eine Verminderung der gerinnungshemmenden Wirkung von Warfarin wurde beschrieben, der dahinterstehende Mechanismus ist jedoch unbekannt. Die Gerinnungsparameter sollten deshalb häufig kontrolliert werden (ifap 2013). Unbekannt ist auch der Mechanismus, der zu einer Verringerung der Ciclosporin-Plasmakonzentration bei gleichzeitiger Anwendung mit Azathioprin bzw. 6-MP führt. Regelmäßige Kontrollen der Ciclosporin-Blutspiegel werden empfohlen (ifap 2013).

Werden nicht-depolarisierende Muskelrelaxantien wie Tubocurarin, Pancuronium oder Gallamin verwendet, ist eine engmaschige Überwachung der Atemfunktion nötig, da die Wirkung der Muskelrelaxantien, vermutlich aufgrund der Hemmung der Phosphodiesterase, abgeschwächt oder aufgehoben sein kann. Die Wirkung von Succinylcholin wird dagegen verstärkt, so dass auch hier besondere Vorsicht geboten ist (GlaxoSmithKline 2007, ifap 2013).

1.2.6. Kontraindikationen

Absolute Kontraindikationen stellen eine Überempfindlichkeit gegen Azathioprin und 6-MP, die gleichzeitige Anwendung von Arzneistoffen mit myelosuppressiver Wirkung wie Penicillamin und Zytostatika, sowie Schwangerschaft und Stillzeit dar.

Als relative Kontraindikationen gelten vorbestehende schwere Infektionen, Leberfunktionsstörungen, schwere Störungen der Knochenmarksfunktion, Pankreatitis, Lesch-Nyhan-Syndrom und die Behandlung von Kindern.

1.3. Thiopurinmethyltransferase (TPMT)

Vor vielen Jahren fand man bei Patienten, die azathioprin-induzierte Leukopenien entwickelten, höher Konzentration an toxischen Metaboliten als bei Patienten, die eine gute Verträglichkeit aufwiesen (Lennard et al. 1984). Später brachte man diesen veränderten Metabolismus mit einem genetischen Polymorphismus der Thiopurinmethyltransferase (TPMT) in Verbindung (Weinshilboum 1989). Eine hohe Konzentration an 6-TGN wird zum einen mit einer höheren Wirksamkeit in Verbindung gebracht, zum anderen entsteht dadurch aber auch eine höhere Myelotoxizität.

Die TPMT ist eines der wichtigsten Enzyme beim Abbau der Thiopurine und das bisher am häufigsten untersuchte. Sie liegt in gelöster Form im Zytoplasma von Leber, Niere, Erythrozyten, Leukozyten usw. vor und katalysiert die Methylierung von SH-Gruppen (= Sulfhydrylverbindungen) in Aromaten oder Heterozyklen. Ein natürliches Substrat und die Funktion der TPMT ist bisher nicht bekannt (Berg und Ford 2010, Krynetski und Evans 2000).



Abbildung 9: Die TPMT (aus Wikipedia; http://en.wikipedia.org/wiki/Thiopurine_methyltransferase; http://en.wikipedia.org/wiki/File:Protein_TPMT_PDB_2bzg.png)

Die Aktivität des Enzyms in den Erythrozyten entspricht der Aktivität des Enzyms in Leber, Nieren und Lymphoblasten, so dass zur Aktivitätsbestimmung die TPMT der Erythrozyten herangezogen werden kann.

Studien haben gezeigt, dass es eine inverse Beziehung zwischen der TPMT-Aktivität und der Akkumulation von 6-TGN gibt. Patienten mit fehlender TPMT-Aktivität akkumulieren schnell hohe Dosen von 6-TGN, was zu schwerer Knochenmarkstoxizität führen kann. Patienten mit mittlerer Aktivität akkumulieren bis zu 50 % mehr 6-TGN im Vergleich zu Patienten mit normaler TPMT-Aktivität, was ebenfalls zu einem erhöhten Risiko für Myelosuppression führt (Lennard et al. 1989).

Die Aktivität der TPMT unterliegt großen interindividuellen Schwankungen. So kann zum Beispiel schon die Thiopurintherapie selbst zu einer 25 – 35 % igen Enzyminduktion führen (Lennard 1998, Evans et al. 2001, Schwab und Klotz 2001, Shipkova und Ahsen 2003), wie auch Interaktionen mit anderen Arzneimitteln die Aktivität der TPMT erheblich beeinflussen (siehe oben).

Den wichtigsten Faktor für die unterschiedliche Pharmakokinetik von Thiopurinen stellt nach heutigen Erkenntnissen jedoch der genetische Polymorphismus der TPMT dar. Bei Patienten mit niedrigerer Aktivität wird 6-MP weniger durch die TPMT abgebaut, so dass sich das Gleichgewicht zu einer erhöhten Produktion von 6-TGN zu verschieben scheint. Patienten unter Standarddosierung (für die jeweilige Indikation), die eine intermediäre TPMT-Aktivität zeigen, bauen meist 2 – 3 mal höhere 6-TGN-Konzentrationen auf als Patienten mit normaler TPMT-Aktivität. Dagegen zeigen Patienten mit sehr hoher Enzymaktivität keinen Effekt der Therapie und haben dafür ein höheres Risiko für Lebertoxizität, da sie mehr Methylmercaptapurin (MMP) bilden, welches hepatotoxisch wirkt.

Eine komplett fehlende TPMT-Aktivität, wie sie sich bei den homozygot defizienten Trägern findet, führt dagegen zu einem hohen Risiko, bei der Standarddosierung eine Azathioprin- bzw. 6-MP induzierte Knochenmarksuppression zu erleiden, da sich hier die 6-TGN maximal (bis auf das 10 – 20 - Fache) anreichern (Anstey et al. 1992, Stolk et al. 1998, Shipkova und Ahsen 2003). Eine so verursachte Leukopenie tritt in den meisten Fällen kurz nach Beginn der Therapie auf. Zeigt sie sich erst später im Verlauf, liegt häufig eine Interaktion mit der Co-Medikation vor (zum Beispiel mit Allopurinol, Sulfasalazin, Osalazin oder Salicylaten) oder es gibt andere Ursachen.

1.3.1. Genetischer Polymorphismus

Der für die TPMT existierende genetische Polymorphismus wird autosomal codominant vererbt und zieht zum Teil erhebliche klinische Konsequenzen nach sich.

Ein genetischer Polymorphismus ist ein monogen vererbtes Merkmal, das sich in der Bevölkerung mit mindestens zwei Phänotypen manifestiert und mit einer Frequenz von mehr als 1 – 2 % vorkommt. Bei einer niedrigeren Frequenz spricht man von einer seltenen genetischen Variante oder einer Mutation (Mikus 2000). Bei einem genetischen Polymorphismus existieren mindestens zwei verschiedene Genotypen bzw. Allele.

Allele sind zwei oder mehrere Ausbildungszustände eines Gens, die auf homologen Chromosomen dieselbe Position besetzen (Ammon 2010).

Je zwei Kopien eines Gens sind an der Merkmalsausbildung beteiligt. Die Anordnung der beiden Allele bestimmt den Genotyp. Liegen zwei gleiche Allele vor, spricht man von homozygoten Trägern eines Merkmals, liegen zwei unterschiedliche Allele vor, handelt es sich um heterozygote Träger.

Unterschiedliche Allele können durch Punktmutation, also den Austausch einer einzigen Base, entstehen. Diese Punktmutationen werden auch als „single nucleotide polymorphism“ (SNP) bezeichnet. Durch den Austausch der Base wird nun während der Proteinbiosynthese eine andere Aminosäure eingebaut, so dass eine neue Enzymvariante entsteht.

Der Phänotyp ist die funktionelle Ausprägung des Genotyps, was sich zum Beispiel bei Enzymen durch eine schnellere oder langsamere Metabolisierung äußern kann.

Im Fall der TPMT sind ca. 0,3 % der kaukasischen Bevölkerung homozygot defiziente Träger und zeigen damit eine deutlich erhöhte Toxizität der Thiopurine (Anstey et al. 1992, Stolk et al. 1998). Rund 11 % sind heterozygot und zeigen eine unterschiedlich schnelle Enzymaktivität, ca. 89 % sind homozygote Wildtypträger mit hoher TPMT-Aktivität und normaler Stoffwechselgeschwindigkeit (Weinshilboum und Sladek 1980, Schaeffeler et al. 2004).

Einige Autoren berichten über eine höhere Enzymaktivität der TPMT bei Männern als bei Frauen (Klemetsdal et al. 1993). Heterozygote Träger zeigen unterschiedliche Konzentrationen an 6-TGN und vermutlich auch eine unterschiedliche Toxizität während der Thiopurintherapie.

Die zelluläre Akkumulation der 6-TGN scheint invers zur TPMT-Aktivität zu sein, da eine hohe TPMT-Aktivität zu einem stärkerem Abbau von 6-MP führt und damit weniger 6-MP zur Bildung der 6-TGN übrig bleibt. Patienten mit fehlender TPMT-Aktivität bilden dagegen sehr hohe 6-TGN-Konzentrationen aus (Krynetski et al. 1996, McLeod et al. 2000, McLeod et al. 1994).

1.3.2. TPMT-Gen

TPMT wurde zuerst von Woodson und Weinshilboum gereinigt und charakterisiert (Woodson und Weinshilboum 1983), (Sahasranaman et al. 2008). Das TPMT-Gen liegt auf Chromosom 6p22.3 und ist 27 kb groß und enthält 9 Exons (Sahasranaman et al. 2008, Szumlanski et al. 1996, Seki et al. 2000). Es existiert ein Wildtyp-Allel, das bei allen ethnischen Gruppen gleich ist, sowie eine Reihe von Allel-Varianten, die ein oder zwei SNP enthalten, was zu „Miss-sense“ oder „Non-sense“-Codons führt. Es sind 17 Allel-Varianten bekannt, darunter die Allele *2;*3A und *3C, die bei rund 80 – 95 % der Menschen vorkommen, die eine mittlere oder niedrige TPMT-Aktivität zeigen (Sahasranaman et al. 2008, Ansari et al. 2002). Die wichtigsten Allele und ihre Mutationen liegen auf Exon 7 (G460A; TPMT *3B), Exon 10 (A719G; TPMT *3C) und Exon 5 (G 238 C; TPMT *2)(Lennard 1992, Krynetski und Evans 1999).

Der Wildtyp wird mit TPMT*1 bezeichnet, die häufigsten Allel-Varianten sind *2, *3A, *3B, *3C und alle zugehörigen TPMT zeigen eine mehr oder minder reduzierte Enzymaktivität.

G 238 C bedeutet, dass an Position 238 Guanin durch Cytosin ersetzt wurde (Tab. 1).

Tabelle 1: Die häufigsten SNPs des TPMT-Gens

Allele	Nukleotid-Position		
	238	460	719
TPMT*1 (Wild-Typ)	G	G	A
TPMT*3A	G	A	G
TPMT*3B	G	A	A
TPMT*3C	G	G	G
TPMT*2	C	G	A

Das *3A-Allel enthält im Vergleich zum Wildtyp zwei Mutationen (sowohl an Position 460 als auch 719) (Tab. 1) und führt zu einer erhöhten Degeneration der TPMT und damit zu einer über 200 - fach niedrigeren TPMT-Aktivität (Weinshilboum 2001).

Jede dieser Mutationen kann auch einzeln vorkommen (*3B: an Position 460; *3C: an Position 719), was ebenfalls zu einer veränderten Enzymkonformation führt. Die Mutation an Position 238 (G -> C) führt zum Beispiel zu einer 100-fachen Reduzierung der Enzymaktivität (Sahasranaman et al. 2008).

Geringe TPMT-Aktivität kann zu einem hohen Level an intrazellulärem 6-TGN führen und birgt damit das potenzielle Risiko einer Myelosuppression. Eine hohe Aktivität dagegen führt zu einer sehr geringen Konzentration an 6-TGN und damit evtl. zu fehlender Wirkung (Sahasranaman et al. 2008).

Zwischen den ethnischen Gruppen gibt es Unterschiede in der Verteilung der Mutationen, was bei der Therapie mit Azathioprin beachtet werden sollte.

Die bei Kaukasiern am häufigste auftretende Gen-Variante ist *3A (ca. 85 %), *2, *3B und *3C treten wesentlich seltener auf.

Bei Afrikanern und Afro-Amerikanern ist ebenso wie bei den Kaukasiern *1 der Wildtyp, das häufigste Allel ist jedoch *3C (Hon et al. 1999, Ameyaw et al. 1999, McLeod et al. 1999). Auch in der asiatischen Bevölkerung ist *3C die häufigste Mutation, *3A kommt nicht vor (Chang et al. 2002, Collie-Duguid et al. 1999, Kubota und Chiba 2001).

1.3.3. Möglichkeiten zum Monitoring der Azathioprintherapie

Wie dargestellt, gibt es viele Faktoren, die die Wirksamkeit und Toxizität der Azathioprintherapie beeinflussen, was entweder zu Therapieversagen oder im schlimmsten Fall zu einer lebensbedrohlichen Myelosuppression führen kann. Deshalb ist es wichtig, eine Möglichkeit zu finden, die Wirksamkeit bzw. Toxizität der Therapie mit Azathioprin zu kontrollieren. Dazu werden üblicherweise regelmäßige Blutbildkontrollen durchgeführt, um z. B. eine Myelosuppression oder Leberschädigung frühzeitig erkennen zu können.

1.3.3.1. Therapeutisches Drug Monitoring

Besser wäre es jedoch, den Therapieverlauf so kontrollieren bzw. vorhersagen zu können, dass Unwirksamkeit oder Nebenwirkungen vermieden werden. Deshalb scheint ein Therapeutisches Drug Monitoring von Azathioprin, 6-MP oder 6-TGN sinnvoll zu sein.

Eine direkte Messung von Azathioprinspiegeln ist jedoch aufgrund der kurzen Halbwertszeit auch nicht sinnvoll. Die Bestimmung der 6-MP-Spiegel ist ebenfalls nur bedingt geeignet, da auch 6-MP eine geringe Halbwertszeit hat und noch nicht die aktive Wirkform darstellt. Zudem besteht keine direkte Korrelation zwischen der Azathioprin-Dosis und dem 6-MP-Serumspiegel (Hippius 1993).

Die Bestimmung der 6-TGN als Surrogatparameter ist ebenso umstritten. Während bei pädiatrischen Patienten mit ALL sowie in der Transplantationsmedizin eine Korrelation zwischen 6-TGN-Konzentration und Effekt zu bestehen scheint (Lennard et al. 1990, Shipkova und Ahsen 2003), ist dieser Zusammenhang bei Patienten mit CED nicht eindeutig zu belegen (Hindorf et al. 2006, Shipkova und Ahsen 2003, Reuther et al. 2003). Auch gibt es, vermutlich aufgrund des komplexen Metabolismus, keine direkte Korrelation der 6-TGN-Konzentration zur Azathioprin-Dosis (Weller et al. 1995).

Zur Optimierung der Azathioprintherapie wäre potenziell auch die Bestimmung von MMPN interessant, da MMPN die Purin-de-novo-Synthese hemmt. Cuffari et al. und Dubinsky et al. konnten keinen Zusammenhang zwischen der MMPN-Konzentration und dem klinischen Erfolg der Therapie beobachten, sie fanden jedoch einen Zusammenhang mit dem Auftreten der Hepatotoxizität. Eine Steigerung der Azathioprin- oder 6-MP-Dosis führt nicht zu einem adäquaten Anstieg der 6-TGN-Konzentration, sondern zu einer Überproduktion von 6-MMPN (Dubinsky et al. 2000, Cuffari et al. 1996). Die Relevanz der MMPN-Bestimmung für die Azathioprintherapie ist immer noch unklar, so dass es weiterer Studien bedarf, dies zu überprüfen (Shipkova und Ahsen 2003).

1.3.3.2. TPMT-Screening

Wie bereits dargestellt, zeigt die TPMT aufgrund ihres Polymorphismus sehr unterschiedliche Aktivitäten, so dass zur Therapieoptimierung die Bestimmung dieser Aktivität sinnvoll zu sein scheint. Die Bestimmung der Aktivität kann entweder durch

Phänotypisierung oder durch Genotypisierung erfolgen. Beide Methoden weisen Vor- und Nachteile auf und werden im Folgenden kurz beschrieben.

1.3.3.2.1. Phänotypisierung

Ein Mangel an TPMT zieht erhöhte Konzentrationen an 6-TGN nach sich, während eine erhöhte Aktivität eine geringere Konzentration an 6-TGN bedeutet.

Bei der Phänotypisierung wird die Aktivität der TPMT in den Erythrozyten bestimmt. Dies ist relativ aufwändig. Da die Aktivität in den Erythrozyten der Aktivität in anderen Geweben, inclusive der Leber, entspricht, ist es möglich, die Aktivitätsbestimmung mit venösem Vollblut durchzuführen. Dabei wird die Menge an 6-MMP bestimmt, die bei der TPMT katalysierten Übertragung einer z. B. fluoreszenz-markierten Methylgruppe von S-Adenosyl-Methionin auf 6-MP entsteht.

Je nach Labor gibt es unterschiedliche Methoden der Probenvorbereitung, unterschiedliche chromatographische Bedingungen und die Angabe der Aktivität erfolgt in unterschiedlichen Einheiten, so dass ein Vergleich der Ergebnisse schwierig ist (Shipkova und Ahsen 2003).

Zur Vorhersage von Myelosuppressionen bei Patienten mit sehr geringer oder keiner TPMT-Aktivität ist die Phänotypisierung gut geeignet, bei Patienten mit mittlerer Aktivität ist jedoch keine gesicherte Aussage bzgl. einer Myelosuppression möglich, da zu viele weitere Faktoren eine Rolle spielen.

Es besteht keine gute Phänotyp – Genotyp – Korrelation, da die Aktivität der TPMT nicht nur durch den Genotyp, sondern auch durch epigenetische Phänomene, wie z. B. Induktion durch die Thiopurintherapie, beeinflusst wird (Lennard et al. 1990). Ebenso kann eine vorausgegangene Bluttransfusion das Ergebnis durch die Anwesenheit von Spendererythrozyten bis zu 120 Tage nach Transfusion verfälschen (Krynetski und Evans 2000). Das Alter der Probe spielt für die Aktivitätsbestimmung ebenfalls eine Rolle (Shipkova und Ahsen 2003).

Um eine sichere Aussage bezüglich des TPMT-Status treffen zu können, wäre es deshalb optimal, jeweils Phänotyp und Genotyp zu bestimmen.

1.3.3.2.2. Genotypisierung

Der Vorteil der Genotypisierung ist, dass sie nicht durch eine vorausgegangene Bluttransfusion und auch nicht so stark durch andere „Umwelteinflüsse“ wie Krankheitsaktivität und Arzneimittelaufnahme beeinflusst wird.

Die Genotypisierung wird mit Hilfe von PCR und Gelelektrophorese durchgeführt (siehe 2.3.). Bei einer Bestimmung des TPMT-Genotyps werden aus rationellen Gründen in der Regel nur die am häufigsten vorkommenden Mutationen 1/*3A/*B/*C/*2, die 80 – 95 % aller Defizienzen bei den Kaukasiern, Asiaten und Afro-Amerikanern verursachen, gescreent. Seltener auftretende Mutationen, die bei ca. 10 % der Bevölkerung auftreten, bleiben so unentdeckt. Es ist jedoch nicht zu erwarten, dass sich darunter noch homozygot defiziente Varianten befinden, die für den Patienten lebensbedrohlich wären.

Vielen Autoren vertreten die Ansicht, dass es eine Genotypisierung der Patienten vor Therapiebeginn ermöglichen würde, diejenigen Patienten zu identifizieren, die von der Therapie profitieren würden und, was noch wichtiger ist, die Patienten zu identifizieren, die eine Leukopenie entwickeln würden.

Die meisten Studien zu diesem Thema wurden bisher an Patienten durchgeführt, die unter CED (Schwab et al. 2002, Ansari et al. 2008, Chevaux et al. 2010, Hindorf et al. 2006, Schedel et al. 2006, Lowry et al. 2001, Dubinsky et al. 2002, Palmieri et al. 2007, Gearry et al. 2003, Colombel et al. 2000, Ansari et al. 2002) oder akuter Leukämie (Evans et al. 2001) litten oder nierentransplantiert (Reuther et al. 2003) waren. Nicht alle Autoren konnten eine direkte Korrelation zwischen TPMT-Genotyp, TPMT-Aktivität und dem Effekt der Azathioprintherapie feststellen, fast alle empfahlen jedoch trotzdem, eine Genotypisierung vor der Therapie durchzuführen, um bei den homozygot defizienten Patienten keine Therapie mit Azathioprin zu beginnen und diese so vor einer Leukopenie zu bewahren und, um bei den Heterozygoten die Therapie mit niedrigeren Dosen zu beginnen und langsam zu steigern, um auch hier einer Leukopenie vorzubeugen.

2. Ziele

Den Einfluss des TPMT-Genotyps auf den Effekt der Azathioprintherapie bei Patienten mit entzündlichen rheumatischen Erkrankungen haben bisher nur wenige Autoren untersucht. Black et al. konnten einen deutlichen Zusammenhang zwischen TPMT-Genotyp und Leukopenie feststellen (Black et al. 1998). Die Arbeiten von Kerstens et al. und Corominas et al., die allerdings mit niedrigen Patientenzahlen durchgeführt wurden (16 und 40 Patienten) bestätigten jedoch dieses Ergebnis ebenso wenig wie die Arbeit von Naughton et al., die den Einfluss des Genotyps bei 120 SLE-Patienten untersuchten (Kerstens et al. 1995, Corominas et al. 2003, Naughton et al. 1999).

Trotz dieser widersprüchlichen Aussagen wird eine Genotypisierung vor der Azathioprintherapie für Patienten mit entzündlich-rheumatischen Erkrankungen immer wieder ausdrücklich empfohlen, meist mit dem Hinweis darauf, dass damit der Entstehung einer Leukopenie vorgebeugt werden kann.

Deshalb soll in dieser Arbeit die Relevanz des Genotyps der TPMT für den Effekt der Azathioprintherapie, auch hinsichtlich einer Leukopenie, bei Patienten mit entzündlichen rheumatischen Erkrankungen untersucht werden. Dabei werden die folgenden Aspekte berücksichtigt:

- Lassen sich deshalb durch eine Genotypisierung vor Azathioprintherapie alle Patienten herausfiltern, die eine Leukopenie entwickeln (heterozygote und homozygot-defiziente Patienten) bzw. die von der Therapie profitieren würden (Wildtypträger)?
- Was bedeutet der TPMT-Polymorphismus für den klinischen Alltag?
- Ist die unterschiedliche TPMT-Aktivität der Hauptgrund für alle sich unter der AZA-Therapie ereignenden UAW / Leukopenien?
- Besteht immer eine deutliche Korrelation zwischen dem Genotyp, der Azathioprinindosis und dem Therapieeffekt (heterozygoter Patient → Erfolg bei niedrigerer Dosis im Vergleich zum Wildtyp oder aber Leukopenie bereits bei Standarddosis)?

3. Methoden

3.1. Patienten

Es wurden retrospektiv 75 Patienten aus dem Universitätsklinikum Jena, Funktionsbereich Rheumatologie & Osteologie ermittelt, die an einer Erkrankung des rheumatischen Formenkreises litten und im Zeitraum von 1979 bis 2006 mit Azathioprin behandelt wurden. Obwohl die Datenerhebung 2011 stattfand, sind in dieser Arbeit nur Patientendaten bis 2006 erfasst, da lediglich bis zu diesem Jahr eine einheitliche Basisdokumentation vorhanden war, so dass mit den Daten aus den darauf folgenden Jahren eine retrospektive Analyse schwer möglich gewesen wäre.

Von allen Patienten wurden Geschlecht, Alter, Erkrankung, Dosierung von Azathioprin, Komedikation, Laborparameter, Behandlungsdauer, Behandlungserfolg und der Genotyp erfasst. Es fanden nur die Patienten Eingang in die Untersuchung, bei denen aufgrund der Basisdokumentation gesicherte Daten zu den oben genannten Parametern vorlagen.

Bei der Beurteilung des therapeutischen Effekts und der unerwünschten Wirkungen von Azathioprin haben wir auch die Komedikation, vor allem hinsichtlich ihres Interaktionspotentials, berücksichtigt. Es zeigte sich, dass für die beobachteten Effekte keine relevanten Interaktionen stattfanden, so dass die Komedikation in der vorliegenden Arbeit nicht einzeln aufgeführt wurde. Lediglich für die Patienten mit Leukopenie wird gesondert auf die Komedikation eingegangen, da diese Patienten für die Arbeit von besonderer Bedeutung sind.

Obwohl aufgrund regelmäßiger Blutbildkontrollen durch die Kliniker viele, zum Teil sehr heterogene und für uns nicht relevante Laborparameter vorlagen, fanden letztendlich nur die Leukozyten- und Leberwerte Eingang in die Beurteilung.

Die Diagnose erstellten die behandelnden Kliniker nach den gängigen Leitlinien (körperliche Untersuchung, bildgebende Verfahren, Entzündungsparameter, Rheumafaktoren, ausführliche Anamnese, DAS-Score) und codierten diese nach ICD 10. Zur besseren Übersicht wurden drei Untergruppen gebildet: Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA), Patienten mit Systemischem Lupus erythematodes (SLE) und Patienten mit verschiedenen anderen rheumatischen Erkrankungen (Sharp-Syndrom, systemische Sklerose, Vaskulitis, ANF pos. Dermatomyositis, Morbus Wegener, Polyarthritits, Polymyositis, Churg-Strauss-Syndrom, Sklerodermie, Kollagenose).

Die Auswertungen wurden sowohl für das gesamte Patientenkollektiv als auch einzeln für die Untergruppen durchgeführt.

Von allen Patienten wurde nach der Einwilligung des Patienten zu Beginn der Untersuchung eine Blutprobe genommen und der TPMT-Genotyp bestimmt. Die Zustimmung der zuständigen Ethik-Kommision lag vor.

3.2. Einteilungs- und Beurteilungskriterien

Um die Auswertung standardisieren zu können, wurden die folgenden Definitionen und Beurteilungskriterien festgelegt:

- **Alter:** bezeichnet das „Alter zu Beginn der Azathioprintherapie“
- **Behandlungsdauer:** lag das Ende der Behandlung oder der Abbruch der Therapie im Beobachtungszeitraum, so wurde die Dauer vom Behandlungsbeginn bis zum Therapieabbruch in Monaten berechnet. Nahmen die Patienten Azathioprin weiterhin ein, so wurde die Dauer der Behandlung bis zum 31.12.2006 berechnet und den Auswertungen zugrunde gelegt
- **Leukopenie:** wurde diagnostiziert, wenn die Werte unter 2,5 Gpt/l sanken
- **Pankreatitis:** wurde durch starke Oberbauchschmerzen und eine Erhöhung der Lipase und Amylase diagnostiziert
- **positiver Effekt:** das Beschwerdebild des Patienten wurde subjektiv besser und die Entzündungsparameter waren rückläufig und/oder eine Reduktion oder das Absetzen von Prednisolon war möglich
- **wirkungslos:** zeigte sich keiner der oben genannten Effekte, wurde die Therapie als wirkungslos eingestuft und nach der entsprechenden Wartezeit (ein Wirkungseintritt ist erst nach einigen Monaten zu erwarten) abgebrochen
- **Outcome:** unter Outcome wurden alle beobachteten Effekte der Azathioprintherapie zusammengefasst: positiver Effekt, Wirkungslosigkeit, Leukopenie, Leberwerterhöhung, Magen-Darmbeschwerden und Pankreatitis
- Eine Erhöhung der Leberwerte um mehr als das Doppelte führte zum Absetzen oder zur Dosisreduktion

Am Ende des Beobachtungszeitraums wurde die Reaktion der Patienten auf Azathioprin untersucht und im Hinblick auf Genotyp, Dosierung und Grunderkrankung beurteilt.

3.3. Genotypisierung

Zur Genotypisierung wurden 2,5 ml venöse EDTA-Vollblutproben gewonnen und im Labor des Arbeitsbereichs Klinische Pharmakologie analysiert (SOP 1-5, siehe Anhang).

Dazu isolierten wir die DNA und amplifizierten sie mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Im Anschluss an den Verdau mit einem Restriktionsenzym detektierten wir nach Gelelektrophorese die vorkommenden Mutationen G238C, G460C und A719C.

Der Nachweis der Allele *2, *3A *3B und *3C erlaubte die Erfassung der häufigsten Mutationen aus den unterschiedlichen ethnischen Gruppen, ca. 5 - 10 % der Defizienzen bleiben hier unerkannt. Lebensbedrohliche homozygote Defizienzen sind nach Ausschluss der oben genannten Mutationen nicht mehr zu erwarten.

3.3.1. PCR

Vor der Untersuchung der DNA auf Mutationen muss sie aus den Erythrozyten isoliert werden. Dies erfolgte nach der Methode von Quiagen mit dem QIAamp® DNA Blood MiniKit 250 nach dem Standardprotokoll (SOP 1, siehe Anhang) des Arbeitsbereichs Klinische Pharmakologie des Universitätsklinikums der Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Die so gewonnene DNA (Template-DNA) kann sofort für die PCR weiterverwendet oder bei $-20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ eingefroren werden, um sie zu einem späteren Zeitpunkt zu verwenden.

Um alle hier interessierenden Allele zu untersuchen, führten wir drei PCR-Ansätze mit den entsprechenden Primern durch (SOP 2 – 4, siehe Anhang).

Bei der Genotypisierung müssen zuerst die entscheidenden Stellen auf der DNA, die für das entsprechende Enzym kodieren, markiert und anschließend vervielfältigt werden. Mit Hilfe der PCR gelingt dies „in einem Schritt“.

Zuerst überführt man die doppelsträngige DNA durch Hitzedenaturierung in Einzelstrang-DNA, die nun als Vorlage für den neuen komplementären Strang dient. Um nur den interessierenden Genabschnitt zu vervielfältigen, werden entsprechende Primer (Oligonukleotide) eingesetzt, die an den Startpunkt für die DNA-Verdopplung binden (Primer-annealing). Während der folgenden Elongationsphase findet eine Verdoppelung der DNA unter Verwendung der zugegebenen Einzelnukleotide und mit Hilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) statt.

Dieser Zyklus wird nun mehrfach durchlaufen, wobei sich die Zahl der DNA-Abschnitte exponentiell erhöht.

3.3.2. Gelelektrophorese

Die so gewonnenen DNA-Abschnitte müssen noch weiter bearbeitet werden, um die Mutationen zu detektieren.

Da die Abschnitte noch relativ lang sind, werden sie für die SNPs 460 und 719 noch einem sog. „Verdau“ durch bestimmte Enzyme (Restriktionsendonukleasen) unterzogen. Die Restriktionsendonukleasen „schneiden“ das DNA-Fragment genau an der Mutationsstelle, so dass drei unterschiedlich lange DNA-Fragmente entstehen können, je nachdem, ob es sich um den Wildtyp, einen hetero- oder homozygoten Mutanten handelt. Die entstandenen Fragmente können nun durch Gelelektrophorese voneinander getrennt werden. Dabei entstehen je nach betrachtetem SNP unterschiedliche Bandenmuster (SOP 3 und 4, siehe Anhang).

Für die Elektrophorese wird ein Agarose-Gel gegossen, an das ein elektrisches Feld angelegt wird. Aufgrund ihrer negativen Ladung wandern die DNA-Abschnitte nun durch das Gel, wobei sie in Abhängigkeit von ihrer Länge unterschiedliche Strecken zurücklegen, so dass sich unterschiedliche Banden auf dem Gel zeigen.

Um diese besser sichtbar zu machen, wird dem Gel Ethidiumbromid zugesetzt, das an die DNA-Fragmente bindet und unter UV-Licht fluoresziert.

Die entstandenen Gele bzw. Fragmentmuster werden zur Allelbestimmung und Dokumentation fotografiert (SOP 5, siehe Anhang).

Für die Mutation an Stelle 238 existiert kein geeignetes Restriktionsenzym, so dass die Gelelektrophorese ohne vorherigen Verdau durchgeführt wird. Stattdessen führt man hier pro Probe zwei verschiedene PCRs durch. Eine PCR enthält einen spezifischen Primer für den Wildtyp, die andere den spezifischen Primer für den Mutanten. In der Elektrophorese trägt man nun immer beide Ansätze nebeneinander auf. Pro Ansatz ist maximal nur eine Bande zu sehen (SOP 2, siehe Anhang).

3.4. Statistische Auswertung

Die Werte wurden in SPSS® Version 18.0 German eingegeben und mit Hilfe deskriptiver Analysen ausgewertet. Es wurden Mittelwert, Standardabweichung, Median, Maximal- und Minimalwerte berechnet.

Die Überprüfung der statistischen Zusammenhänge erfolgte mit dem Chi-Quadrat-Test (parametrische Variablen) sowie dem Mann-Whitney-U-Test (für nicht-parametrische Variablen), p-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet.

4. Ergebnisse

4.1. Geschlecht und Erkrankung

Von diesen 75 Patienten waren 68 % (51) weiblich und 32 % (24) männlich (Abb. 10).

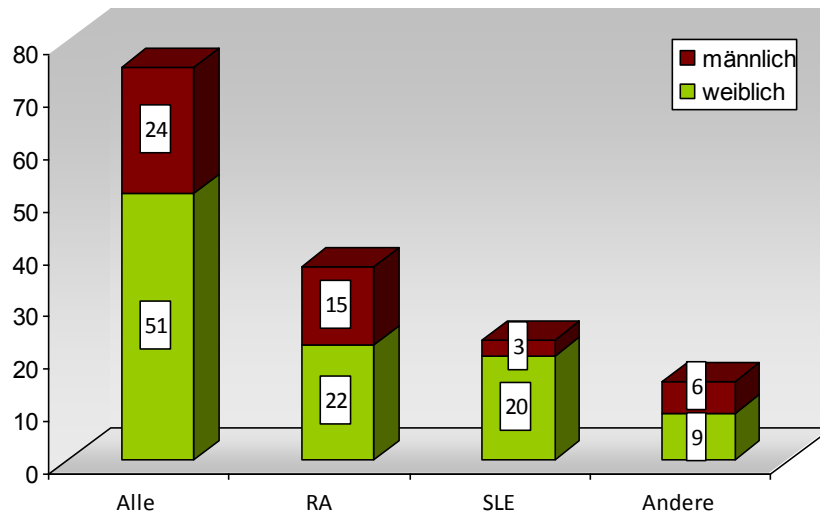


Abbildung 10: Geschlechterverteilung aller Patienten, aufgeteilt nach Erkrankungen

49,3 % (37) dieser Patienten hatten eine rheumatoide Arthritis, 30,7 % (23) SLE und 20 % (15) litten unter anderen rheumatischen Erkrankungen.

Innerhalb der einzelnen Erkrankungsgruppen war die Verteilung der Geschlechter ähnlich wie im gesamten Kollektiv, d. h. es waren immer mehr Frauen als Männer erkrankt. So waren bei den Patienten mit rheumatoider Arthritis 59,5 % (22) Frauen und 40,5 % (15) Männer, bei den Patienten mit SLE sogar 87 % (20) Frauen und nur 13 % (3) Männer und bei den restlichen Patienten 60 % (9) Frauen und 40 % (6) Männer (Abb. 10).

4.2. Alter

Das durchschnittliche Alter zu Beginn der Therapie mit Azathioprin betrug 52 Jahre, der Median lag bei 53 Jahren. Die jüngste Patientin war zu Therapiebeginn 8 Jahre, der älteste Patient 77 Jahre (Tab. 2).

Betrachtet man nur die Patienten mit RA, so lagen das durchschnittliche Alter sowie der Median zu Therapiebeginn bei 58 Jahren, der jüngste Patient war 33, der Älteste 77 Jahre alt (Tab. 2). Die Patienten mit SLE waren zu Therapiebeginn mit durchschnittlich 44 Jahren deutlich jünger. Der Median wurde mit 45 Jahren bestimmt, die jüngste Patientin war 19 Jahre, die Älteste 64 Jahre alt (Tab. 2). Bei den Patienten mit anderen rheumatischen Erkrankungen lag das durchschnittliche Alter zu Therapiebeginn bei 50 Jahren, der Median bei 51 Jahren und die jüngste Patientin war zu Therapiebeginn 8 Jahre alt, der älteste Patient 76 (Tab. 2).

Tabelle 2: Mittleres Alter der Patienten zu Beginn der Azathioprintherapie

Alter	Alle	RA	SLE	Andere
Mittelwert	52	58	44	50
Median	53	58	45	51
Minimum	8	33	19	8
Maximum	77	77	64	76

4.3. Genotyp

Hinsichtlich der Genotypisierung zeigte sich folgende Verteilung:

86,7 % (65) der Patienten waren Wildtypträger, 13,3 % (10) trugen eine Mutation.

Unter den Patienten mit Mutation kam bei 6 Patienten (8,0 %) das *1/*3A-Allel vor, bei 2 Patienten (2,7 %) das *1/*3B-Allel und jeweils 1 Patient besaß das *1/*3C und *1/*2 Allel.

Die mit 0,3 % sehr selten auftretenden homozygoten Mutanten kamen (wie bei dieser kleinen Population erwartet) nicht vor (Abb. 11; Tab. 3).

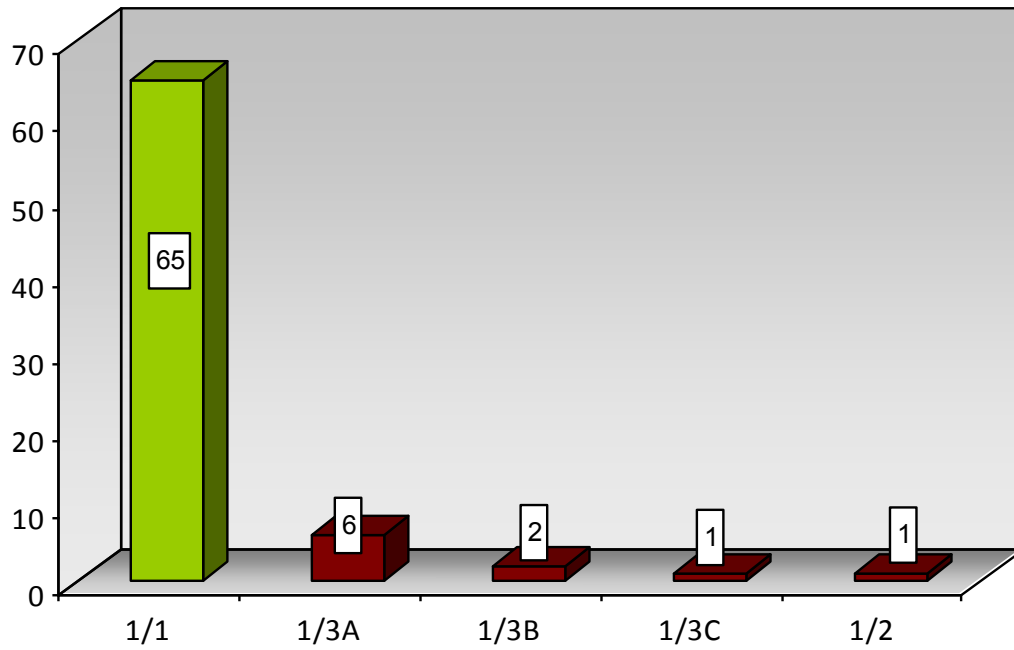


Abbildung 11: Verteilung der Genotypen

Tabelle 3: Verteilung der Genotypen

Genotyp		Anzahl	Prozent
Wildtyp	1/1	65	86,7
Heterozygot	gesamt	10	13,3
	1/3A	6	8,0
	1/3B	2	2,7
	1/3C	1	1,3
	1/2	1	1,3

Da eine statistische Aussage mit so kleinen Patientenzahlen nicht sinnvoll zu erzielen ist, wurden nach Anraten des Statistikers alle Patienten mit Mutation zur Gruppe der „Heterozygoten“ zusammengefasst. Dies betraf insgesamt 10 Patienten (13,3 %) (Abb. 12).

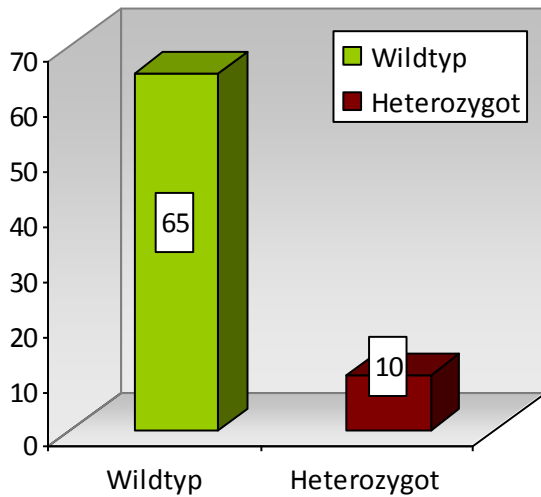


Abbildung 12: Verteilung der Patienten auf die unterschiedlichen Genotypen

Unter den Patienten mit RA waren 33 (89,2 %) Patienten Wildtypträger und 4 (10,8 %) zeigten eine Mutation (1/3A und 1/2) (Abb. 13).

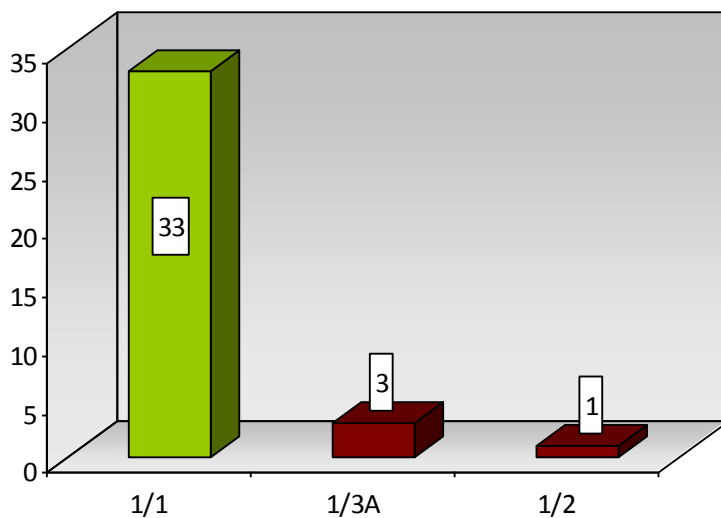


Abbildung 13: Verteilung der Genotypen innerhalb der Patienten mit RA

4.4. Therapiedauer

Die durchschnittliche Therapiedauer betrug 71 Monate (Median: 55 Monate). Eine Patientin brach die Therapie bereits nach einem Monat wegen Übelkeit und Erbrechen ab, die längste

Therapiedauer betrug am Ende des Beobachtungszeitraums 335 Monate, die Therapie war zu diesem Zeitpunkt noch nicht beendet (Tab. 4).

Für die Patienten mit RA betrug die durchschnittliche Einnahmedauer nur 56 Monate, der Median lag hier bei 45 Monaten. In diese Gruppe war auch der Patient eingeschlossen, der die Therapie bereits nach einem Monat abgebrochen hatte; die längste Therapiedauer betrug 280 Monate (Tab. 4).

Dagegen wurde bei den Patienten mit SLE die Therapie durchschnittlich 94 Monate durchgeführt, im Median 70 Monate. Die kürzeste Therapiedauer betrug 27 Monate, die längste 335 (Tab. 4).

Für alle anderen lag die Therapiedauer bei durchschnittlich 71 Monaten, der Median betrug 48 Monate. Hier war die kürzeste Therapiedauer 5 Monate, die längste 282 Monate (Tab. 4).

Tabelle 4: Dauer der Azathioprineinnahme

Einnahmedauer in Monaten	Alle	RA	SLE	Andere
Mittelwert	71	56	94	71
Median	55	45	70	48
Minimum	1	1	27	5
Maximum	335	280	335	282

Im Hinblick auf die Beantwortung der Frage, ob und welchen Einfluss der genetische Polymorphismus der TPMT auf eine Therapie mit Azathioprin hat, ist es sinnvoll, die Therapiedauer auch im Hinblick auf die unterschiedlichen Genotypen zu betrachten.

Man sieht hier, dass die durchschnittliche Therapiedauer für alle Patienten bei den Wildtypträgern mit 73 Monaten länger war als bei den Heterozygoten mit 57 Monaten; der Median lag hier bei 58 Monaten, bei den Heterozygoten bei 52 Monaten. Die längste Therapiedauer bei den Wildtypträgern betrug 335 Monate, bei den Heterozygoten 152 Monate. Die kürzeste Therapiezeit lag bei 1 Monat bei den Wildtypträgern und bei 14 Monaten bei den Heterozygoten (Tab. 5; Abb. 14).

Es bestand jedoch kein signifikanter Zusammenhang zwischen Genotyp und Therapiedauer ($p = 0,710$, Mann-Whitney-U-Test).

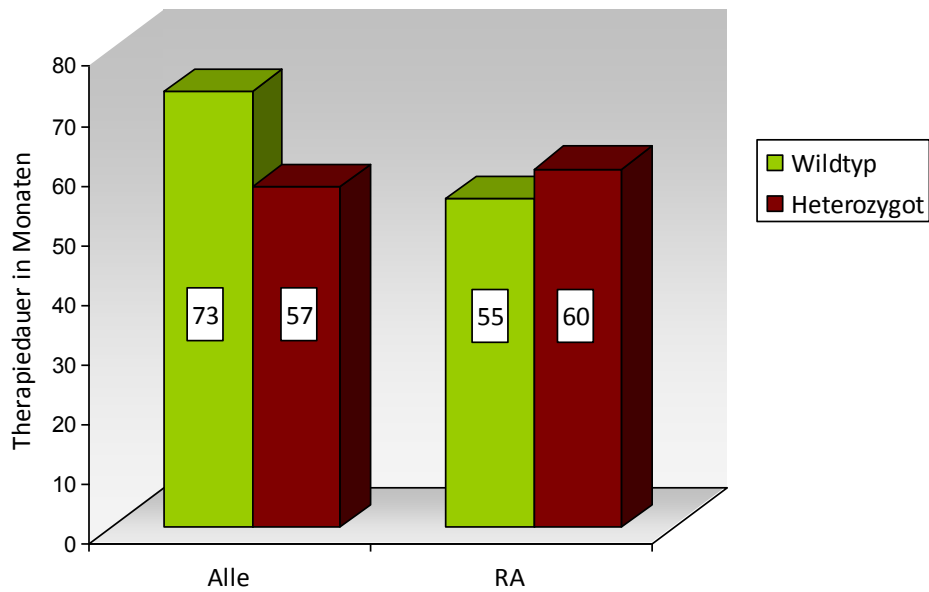


Abbildung 14: Durchschnittliche Dauer der Azathioprineinnahme in Bezug auf den Genotyp

Tabelle 5: Einnahmedauer von Azathioprin hinsichtlich des Genotyps

Einnahmedauer in Monaten	Wildtyp	Heterozygot
Mittelwert	73	57
Median	58	52
Minimum	335	152
Maximum	1	14

Für Patienten mit RA zeigte sich ein etwas anderes Bild.

Während bei allen Patienten die Wildtypträger die längere Therapiedauer aufwiesen, zeigten sie bei den RA-Patienten mit einer durchschnittlichen Therapiedauer von 55 Monaten (Median: 45 Monate) eine kürzere Therapiedauer als die Heterozygoten mit 60 Monaten (Median: 37 Monate). Die längste Therapiedauer betrug bei den Wildtypträgern 280 Monate, bei den Heterozygoten 152 Monate. Die kürzeste Therapiezeit lag bei 1 Monat bei den Wildtypträgern (Abbruch wegen Übelkeit und Erbrechen) und bei 14 Monaten bei den Heterozygoten (Abb. 14; Tab. 6).

Es bestand auch hier kein signifikanter Zusammenhang zwischen Genotyp und Therapiedauer ($p = 0,990$, Mann-Whitney-U-Test).

Tabelle 6: Einnahmedauer von Azathioprin bei RA-Patienten bezogen auf den Genotyp

Einnahmedauer in Monaten (nur für RA-Patienten)	Wildtyp	Heterozygot
Mittelwert	55	60
Median	45	37
Minimum	1	14
Maximum	280	152

Aufschlussreich ist es auch, die Verteilung der Genotypen nur bei Patienten mit Leukopenie zu betrachten. Dabei sieht man, dass die Patienten mit Leukopenie, die Wildtypträger waren, durchschnittlich kürzer behandelt wurden (52 Monate, Minimum 4 Monate, Maximum 86 Monate) als die Heterozygoten mit Leukopenie (90 Monate, Minimum 27 Monate, Maximum 152 Monate) (Abb. 15; Tab. 7).

Unter den Wildtypträgern befand sich auch der Patient mit der kürzesten Therapiedauer (4 Monate; Therapieabbruch wegen Leukopenie).

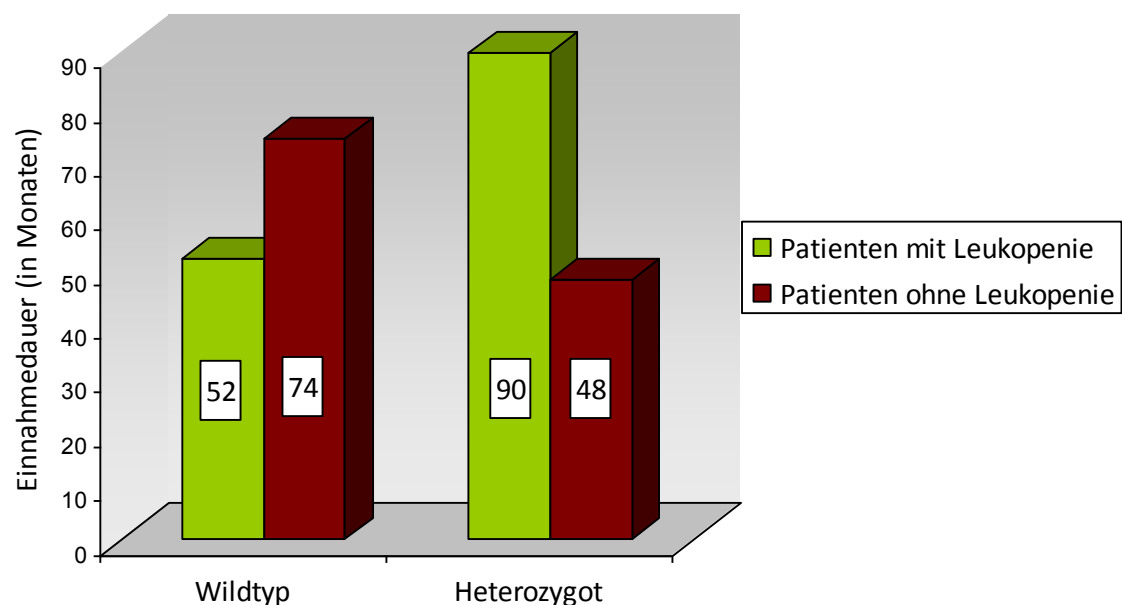
**Abbildung 15:** Durchschnittliche Therapiedauer abhängig vom Genotyp im Vergleich von Patienten mit Leukopenie und ohne Leukopenie

Tabelle 7: Durchschnittliche Therapiedauer abhängig vom Genotyp im Vergleich von Patienten mit Leukopenie und ohne Leukopenie

Einnahmedauer in Monaten	Wildtyp	Heterozygot
Patienten mit Leukopenie	52	90
Patienten ohne Leukopenie	74	48

4.5. Azathiopridosis

Die durchschnittliche Azathiopridosis für alle Patienten betrug 1,74 mg/kg KG (Median 1,67 mg/kg KG). Die niedrigste Dosis wurde mit 0,67 mg/kg KG, die höchste Dosis mit 3,5 mg/kg KG ermittelt.

RA-Patienten wurden dagegen im Durchschnitt mit etwas niedrigeren Dosen behandelt (Mittelwert 1,72 mg/kg KG, Median 1,56 mg/kg KG, Minimum 1,0 mg/kg KG, Maximum 3,0 mg/kg KG). Zur Behandlung des SLE lag die durchschnittliche Dosis höher, im Mittelwert bei 1,87 mg/kg KG (Median 1,89 mg/kg KG; Minimum 0,67 mg/kg KG). Hier gab es aber auch die größte Spannweite von 0,67 mg/kg KG bis zu 3,5 mg/kg KG.

Auch bei der Behandlung der anderen Erkrankungen wurde eher etwas niedriger dosiert (Mittelwert 1,58 mg/kg KG, Median 1,61 mg/kg KG; Minimum) (Tab. 8).

Tabelle 8: Durchschnittliche Azathioprin-Dosis

Durchschnittliche AZA-Dosis in mg/kg KG	Alle	RA	SLE	Andere
Mittelwert	1,74	1,72	1,87	1,58
Median	1,67	1,56	1,89	1,61
Minimum	0,67	1,00	0,67	0,81
Maximum	3,50	3,00	3,50	2,68

Heterozygote Patienten wurden durchschnittlich mit einer höheren Dosis behandelt (Mittelwert 1,87 mg/kg KG, Median 1,94 mg/kg KG, Maximum 2,83 mg/kg KG, Minimum 0,88 mg/kg KG) als Wildtypträger (Mittelwert 1,71 mg/kg KG, Median 1,61 mg/kg KG,

Maximum 3,50 mg/kg KG, Minimum 0,67 mg/kg KG), ein signifikanter Unterschied zwischen Heterozygoten und Wildtypträgern war jedoch nicht zu erkennen ($p=0,376$, t-Test) (Abb. 16; Tab. 9).

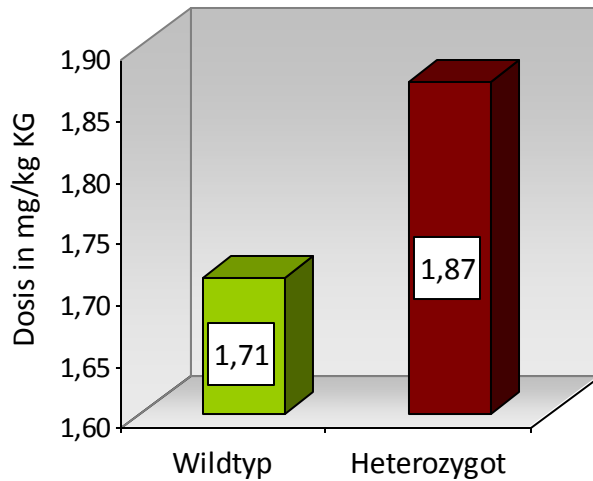


Abbildung 16: Mittlere Tagesdosis Azathioprin bezogen auf den Genotyp

Tabelle 9: Durchschnittliche Azathioprindosis hinsichtlich des Genotyps

Durchschnittliche AZA-Dosis in mg/kg KG	Wildtyp	Heterozygot
Mittelwert	1,71	1,87
Median	1,61	1,94
Maximum	3,50	2,83
Minimum	0,67	0,88

Auch bei den Patienten mit RA wurden die heterozygoten Genträger durchschnittlich mit höheren Dosen Azathioprin behandelt (Mittelwert 2,09 mg/kg KG, Median 2,19 mg/kg KG, Maximum 2,83 mg/kg KG, Minimum 1,16 mg/kg KG) als die Wildtypträger (Mittelwert 1,68 mg/kg KG, Median 1,56 mg/kg KG, Maximum 3,0 mg/kg KG, Minimum 1,0 mg/kg KG) (Abb. 17; Tab. 10).

Ein signifikanter Unterschied war auch hier nicht zu erkennen ($p = 0,092$; t-Test).

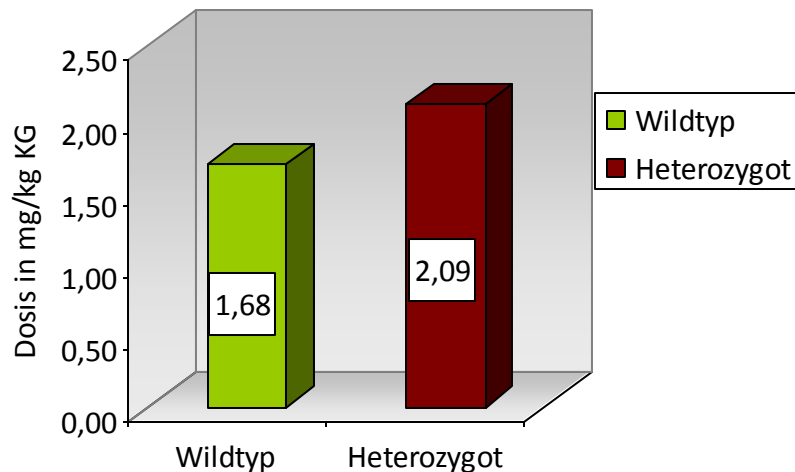


Abbildung 17: Mittlere Tagesdosis Azathioprin bezogen auf den Genotyp bei Patienten mit RA

Tabelle 10: Azathioprindosis für RA-Patienten hinsichtlich des Genotyps

Durchschnittliche AZA-Dosis in mg/kg KG (nur für RA-Patienten)	Wildtyp	Heterozygot
Mittelwert	1,68	2,09
Median	1,56	2,19
Minimum	1,00	1,16
Maximum	3,00	2,83

4.5.1. Dosis und Outcome

Zusätzlich wurde getestet, ob ein statistischer Zusammenhang zwischen der mittleren Azathioprindosis in mg/kg KG und einem positiven therapeutischen Effekt besteht. Die mittlere Tagesdosis, bei der bei allen Patienten ein positiver therapeutischer Effekt erreicht wurde, betrug hier 1,75 mg/kg KG (Tab. 11).

Ein statistischer Zusammenhang bestand nicht (t-Test, $p = 0,599$).

Für RA-Patienten betrug die mittlere Tagesdosis, bei der ein positiver Effekt erreicht wurde 1,70 mg/kg KG (Tab. 11). Ein statistischer Zusammenhang bestand nicht (t-Test, $p = 0,539$).

Dafür konnte ein statistischer Zusammenhang zwischen der mittleren Azathioprindosis und dem Auftreten einer Leukopenie festgestellt werden (t-Test, $p = 0,049$). Die mittlere Dosis bei Leukopenie betrug 2,18 mg/kg KG und ohne Leukopenie 1,70 mg/kg KG (Tab. 11).

Für RA-Patiente alleine ließ sich dieser Zusammenhang jedoch nicht darstellen (t-Test; $p=0,080$), die mittlere Azathioprin-Dosis betrug hier bei Leukopenie 2,17 mg/kg KG und ohne Leukopenie 1,68 mg/kg KG (Tab. 12).

Tabelle 11: Zusammenhang Dosis / Leukopenie und positivem therapeutischem Effekt

Durchschnittliche AZA-Dosis in mg/kg KG	Alle	RA
Positiver Effekt	1,75	1,70
Leukopenie	2,18	2,17
Keine Leukopenie	1,70	1,68

4.5.2. Dosis, Genotyp und Outcome

Vergleicht man die durchschnittliche Azathioprin-Dosis in Bezug auf das gesamte Outcome-Spektrum (Abb. 18; Tab. 13), so zeigt sich, dass bei den Patienten mit positivem Effekt die Wildtypträger durchschnittlich mit einer niedrigeren Dosis behandelt wurden als die Heterozygoten (1,72 mg/kg KG versus 1,79 mg/kg KG), während eine Leukopenie bei den Wildtypträgern erst bei einer höheren Dosis auftrat als bei den Heterozygoten (2,4 mg/kg KG versus 1,86 mg/kg KG).

Eine Leberfermenterhöhung trat bei den Wildtypträgern durchschnittlich bei einer niedrigeren Dosis als bei den Heterozygoten (1,26 mg/kg KG versus 1,61 mg/kg KG) auf.

GIT-Beschwerden und Pankreatitis wurden nur bei den Wildtypträgern eruiert (Abb. 18; Tab. 12).

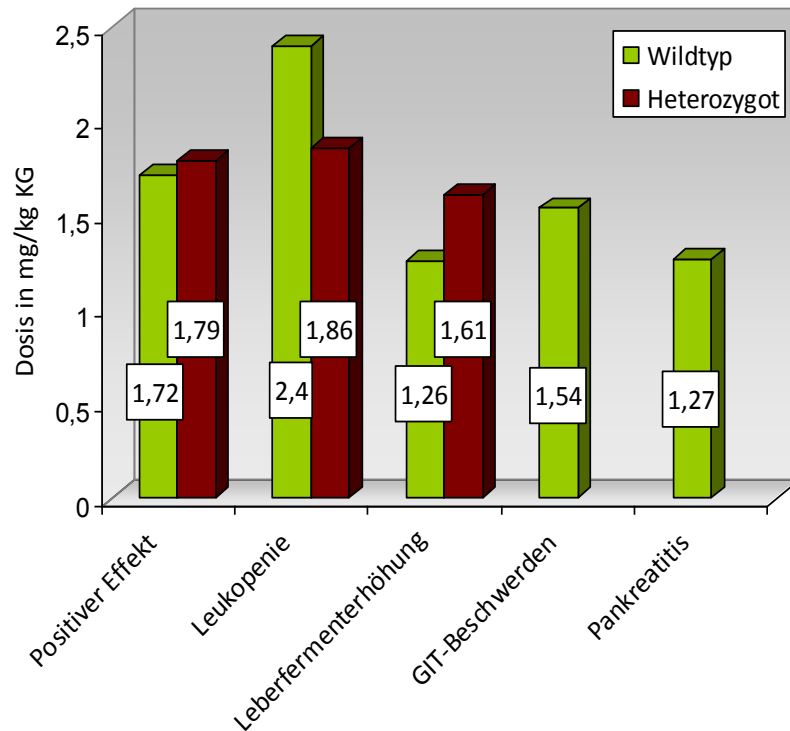


Abbildung 18: Durchschnittliche Azathioprindosis in mg/kg KG hinsichtlich Genotyp und Outcome

Tabelle 12: Durchschnittliche Azathioprindosis in mg/kg KG hinsichtlich Genotyp und Outcome

Durchschnittliche AZA-Dosis in mg/kg KG	Positiver Effekt	Leukopenie	Leberferment-erhöhung	GIT-Beschwerden	Pankreatitis
Wildtyp	1,72	2,40	1,26	1,54	1,27
Heterozygot	1,79	1,86	1,61		

4.6. Outcome

Bei 59 Patienten (78,7 %) zeigte sich ein positiver Effekt, bei 12 Patienten (16 %) wurde das Auftreten einer UAW beobachtet. Wegen Wirkungslosigkeit wurde bei 4 Patienten (5,3 %) die Therapie beendet (Abb. 19; Tab. 10).

Bei den UAWs handelte es sich um Leukopenien (5 Patienten; 6,7 %), Leberfermenterhöhung (4 Patienten; 5,3 %), Übelkeit und Erbrechen (2 Patienten, 2,7 %) und Pankreatitis (1 Patient, 1,3 %) (Abb. 19; Tab. 13).

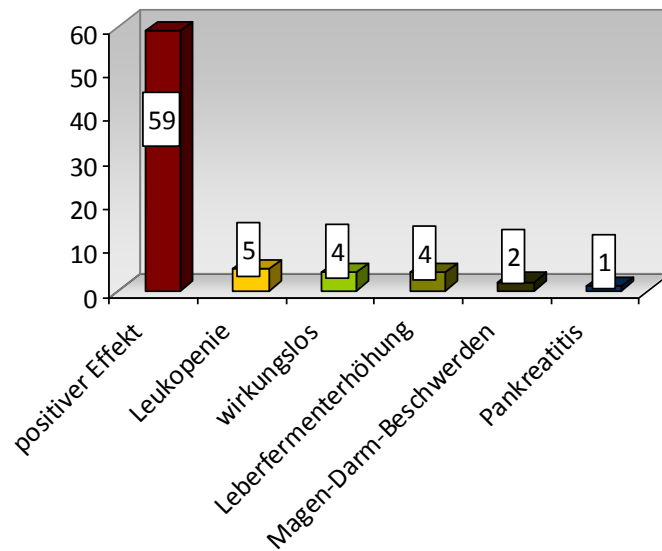


Abbildung 19: Outcome (für alle Patienten)

Tabelle 13: Outcome (für alle Patienten, prozentualer Anteil)

Outcome		Anzahl	Prozent
Positiver Effekt		59	78,7
Wirkungslos		4	5,3
UAW	Leukopenie	5	6,7
	Leberfermenterhöhung	4	5,3
	Magen-Darm-Beschwerden	2	2,7
	Pankreatitis	1	1,3
gesamt		75	100

Von den 37 Patienten mit RA zeigten 67,6 % (25) einen klinisch positiven Effekt, jeweils 8,1 % (3) eine Leukopenie sowie Leberfermenterhöhung, bei 10,8 % (4) war Azathioprin wirkungslos und 5,4 % (2) hatten Magen-Darm-Beschwerden (Abb. 20; Tab. 14).

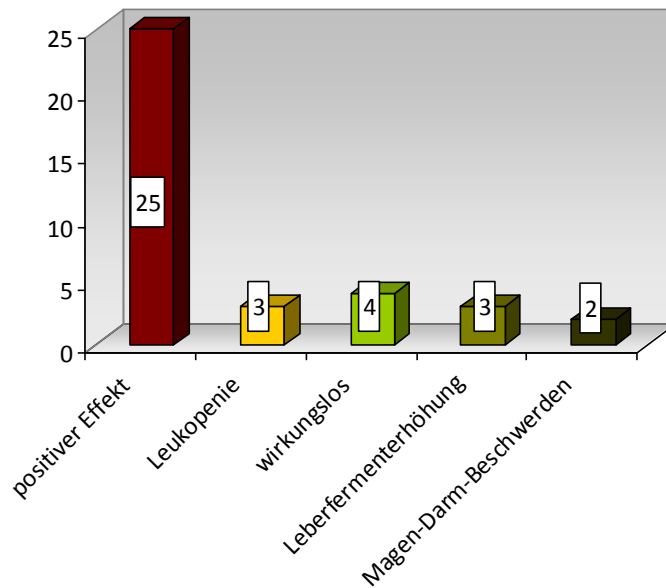


Abbildung 20: Outcome für Patienten mit RA

Tabelle 14: Outcome (für Patienten mit RA, prozentualer Anteil)

Outcome		Anzahl	Prozent
Positiver Effekt		25	67,6
Wirkungslos		4	10,8
UAW	Leukopenie	3	8,1
	Leberfermenterhöhung	3	8,1
	Magen-Darm-Beschwerden	2	5,4
	Pankreatitis	0	0
gesamt		37	100

4.4.1. Genotyp und Outcome

Auch hier ist es aufgrund der Fragestellung interessant, das Outcome im Hinblick auf den Genotyp zu betrachten.

Von den Patienten, die eine Leukopenie aufwiesen (5 Patienten), waren 40 % (2) heterozygot, unter den Patienten mit positivem Effekt (59) waren es 11,9 % (7) und bei den Patienten ohne Wirksamkeit (4) waren es 25 % (1). Unter den Patienten mit Leberfermenterhöhung (4), Magen-Darm-Beschwerden (2) und Pankreatitis (1) war keiner heterozygot (Abb. 21).

Einen statistischen Zusammenhang zwischen Outcome und Genotyp gab es nicht (χ^2 -Test; $p = 0,390$).

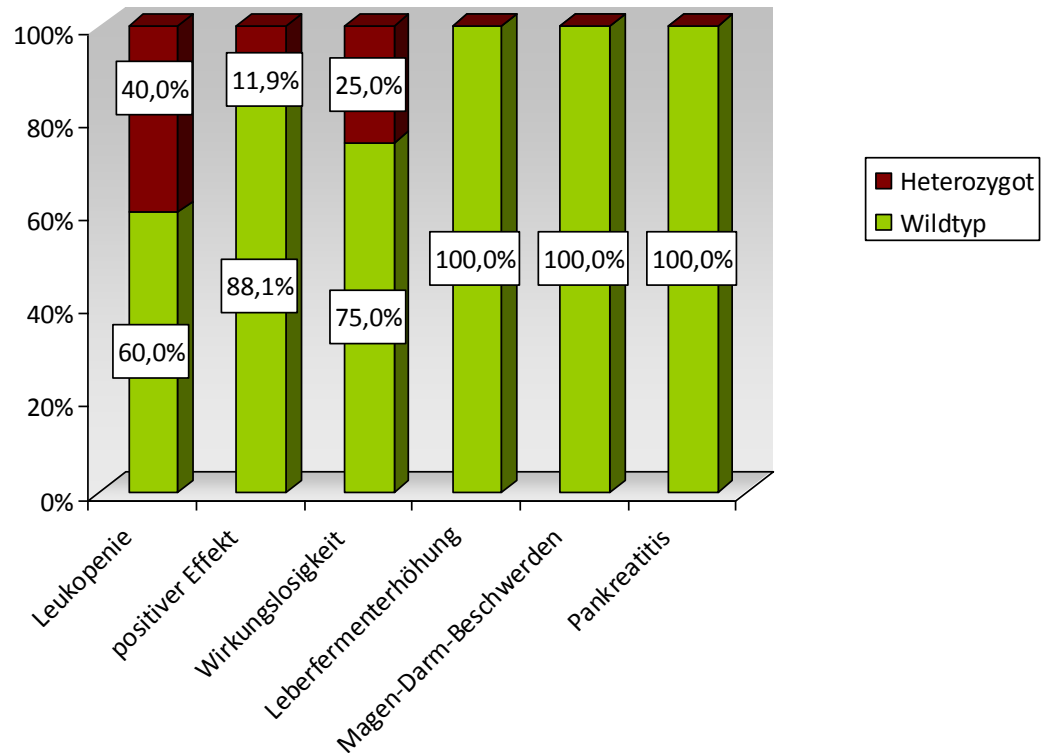


Abbildung 21: Outcome für alle Patienten in Bezug auf den Genotyp

Es zeigte sich, dass die Azathioprintherapie bei den Wildtypträgern (65) bei 80 % (52) einen positiven Effekt hatte, bei jeweils 4,6 % (3) entwickelten sich eine Leukopenie bzw. war die Gabe von Azathioprin wirkungslos. 6,2 % (4) der Patienten reagierten mit Leberfermenterhöhungen, 3,1 % (2) mit Magen-Darm-Beschwerden, 1 Patient 1,5 % erlitt eine Pankreatitis.

Unter den heterozygoten Patienten (10) entwickelten 70 % (7) einen positiven Effekt, 20 % (2) zeigten eine Leukopenie und 10 % (1) zeigten Wirkungslosigkeit (Abb. 22, Tab. 15).

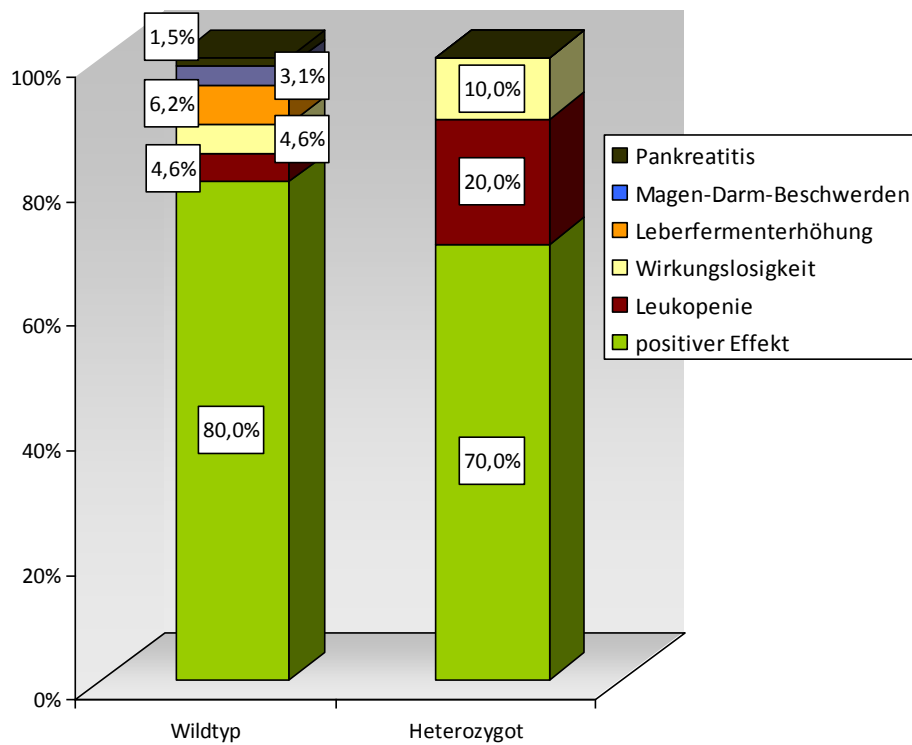


Abbildung 22: Outcome in Bezug auf den Genotyp für alle Patienten

Tabelle 15: Outcome in Bezug auf den Genotyp für alle Patienten

Outcome		Wildtyp	Heterozygot	gesamt
Positiver Effekt		52 (80 %)	7 (70 %)	59
Wirkungslos		3 (4,6 %)	1 (10 %)	4
UAW	Leukopenie	3 (4,6 %)	2 (20 %)	5
	Leberfermenterhöhung	4 (6,2 %)	0	4
	Magen-Darm-Beschwerden	2 (3,2 %)	0	2
	Pankreatitis	1 (1,5 %)	0	1
gesamt		65 (100 %)	10 (100 %)	75

Betrachtet man das Outcome hinsichtlich des Genotyps nur für RA-Patienten, kommt man zu einem ähnlichen Ergebnis.

Von den Patienten mit positivem Effekt (25) waren 8 % (2) heterozygot, unter den Patienten mit Leukopenie (3) waren es 33,3 % (1) und bei den Patienten ohne Wirksamkeit (4) waren es 25 % (1). Kein Patient mit Leberfermenterhöhung (3) und Magen-Darm-Beschwerden (2) gehörte dem heterozygoten Typ an. Eine Pankreatitis trat nicht auf (Abb. 23).

Einen statistischen Zusammenhang zwischen Outcome und Genotyp gab es auch bei den RA - Patienten nicht (χ^2 -Test; $p = 0,460$).

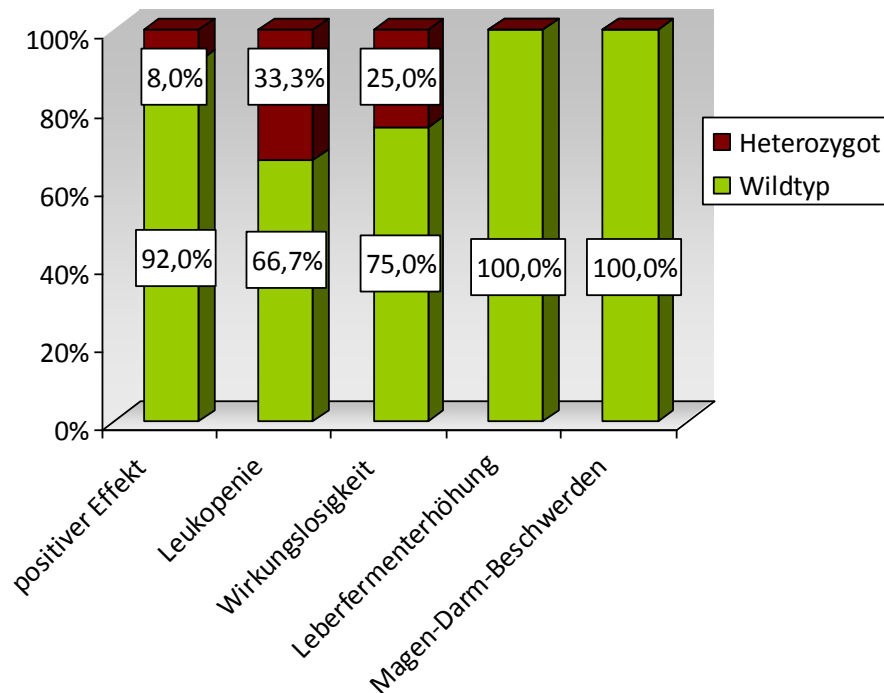


Abbildung 23: Outcome bzgl. des Genotyps nur für RA-Patienten

Auch hier zeigte sich bei den RA-Patienten mit Azathioprineinnahme unter den Wildtypträgern (33) bei 69,7 % (23) ein positiver Effekt. Jeweils 6,1 % (2) entwickelten eine Leukopenie bzw. Magen-Darm-Beschwerden und bei jeweils 9,1 % (3) war AZA wirkungslos bzw. zeigte sich eine Leberfermenterhöhung. Eine Pankreatitis kam bei den RA-Patienten nicht vor.

In der Gruppe der heterozygoten Patienten (4) konnte mit der Azathioprintherapie bei 50 % (2) der behandelten Patienten ein positiver Effekt erzielt werden. Jeweils 25 % (1) zeigten eine Leukopenie bzw. Wirkungslosigkeit (Abb. 24; Tab. 16).

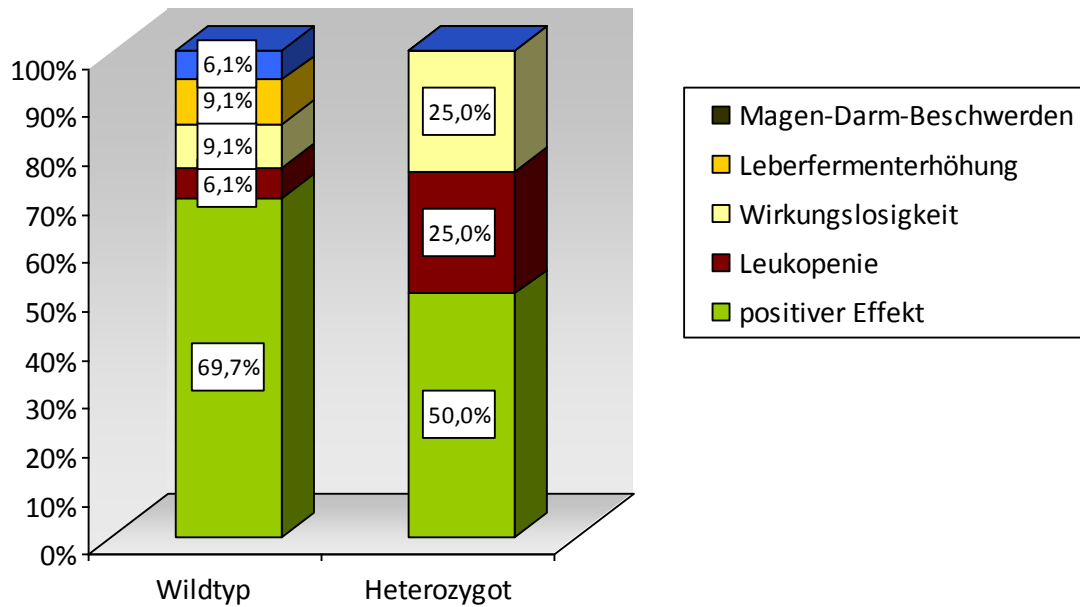


Abbildung 24: Outcome in Bezug auf den Genotyp nur für RA-Patienten

Tabelle 16: Outcome in Bezug auf den Genotyp nur für RA-Patienten

Outcome		Wildtyp	Heterozygot	gesamt
Positiver Effekt		23 (69,7 %)	2 (50 %)	25
Wirkungslos		3 (9,1 %)	1 (25 %)	4
UAW	Leukopenie	2 (6,1 %)	1 (25 %)	3
	Leberfermenterhöhung	3 (9,1 %)	0	3
	Magen-Darm-Beschwerden	2 (6,1 %)	0	2
	Pankreatitis	0	0	0
gesamt		33 (100 %)	4 (100 %)	37

4.4.2. Genotyp und positiver Effekt

Unter allen Patienten, bei denen ein positiver Effekt zu beobachtet war (59 Patienten), gehörten 52 zu den Wildtypträgern (88,1 %), 7 Patienten waren heterozygot (11,9 %). Von den Patienten ohne positiven Effekt (16) waren 81,3 % (13) Wildtypträger und 18,7 % (3) heterozygot (Tab. 15; Abb. 25).

Einen statistischen Zusammenhang zwischen Genotyp und positivem Effekt gab es nicht (χ^2 -Test; $p = 1,0$).

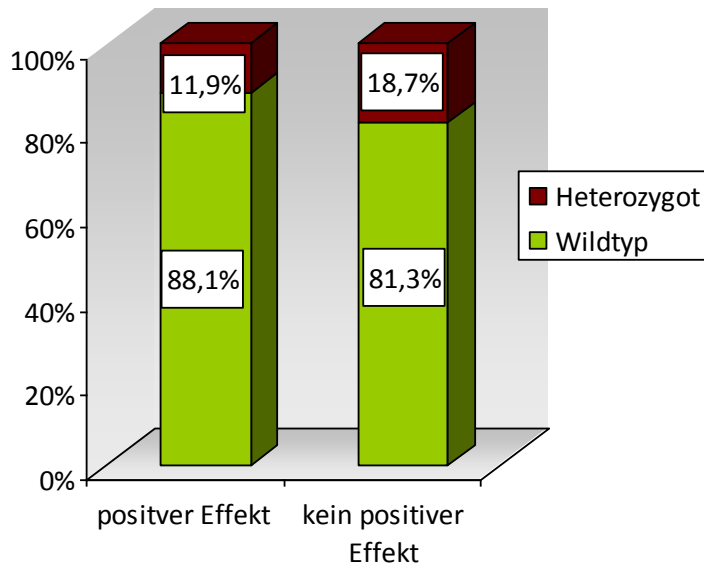


Abbildung 25: therapeutischer Effekt von Azathioprin in Bezug auf den Genotyp

Hier zeigt sich auch deutlich, dass sowohl bei den Wildtypträgern als auch bei den Heterozygoten die meisten Patienten von der Therapie profitierten (80 % bei den Wildtypträgern, 90 % bei den Heterozygoten) (Tab. 15; Abb. 26).

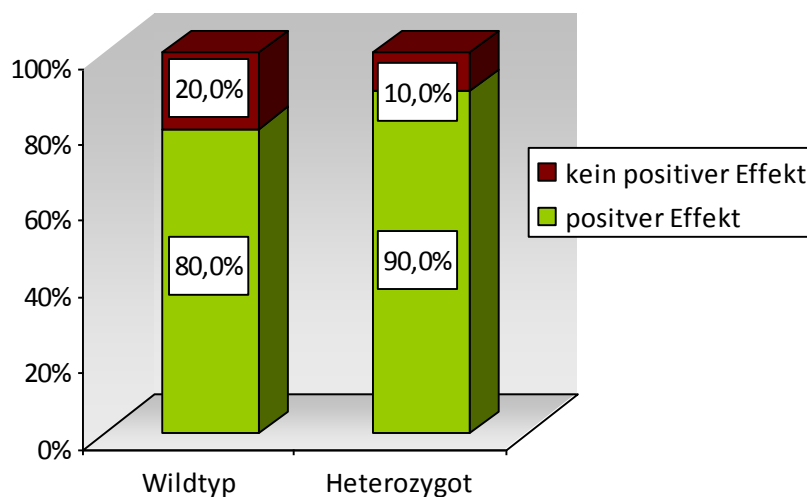


Abbildung 26: Verteilung des therapeutischer Effekts von Azathioprin innerhalb der unterschiedlichen Genotypen

Unter den Patienten mit RA, bei denen man einen positiven Effekt beobachtete (25), waren 92 % (23) Wildtypträger und 8 % (2) heterozygot. Von den Patienten ohne positiven Effekt (12) waren 98,3 % (10) Wildtypträger und 1,7 % (2) heterozygot (Tab. 16; Abb. 27).

Einen statistischen Zusammenhang zwischen Genotyp und positivem Effekt gab es auch bei den RA-Patienten nicht (χ^2 -Test; $p = 1,0$).

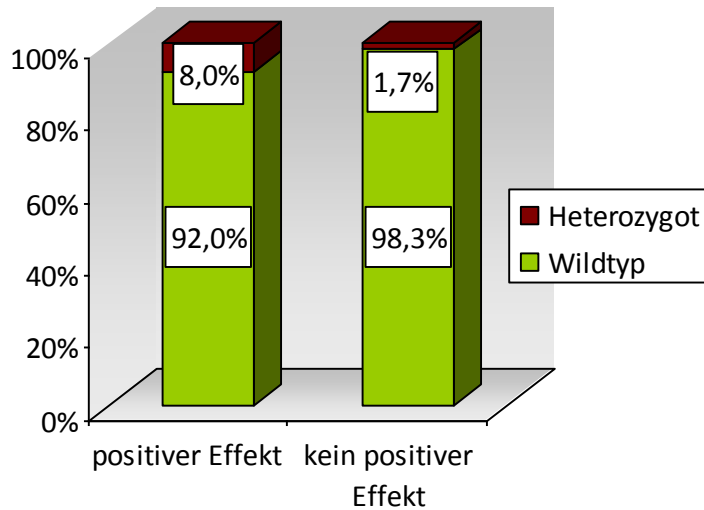


Abbildung 27: positiver Effekt bei den Patienten mit RA

Bei den RA-Patienten (37) hatten 69,7 % (23) der Wildtypträger (insgesamt 33) einen positiven Effekt unter Azathiopringabe, während es hier bei den heterozygoten (4) nur 50 % (2) waren (Tab. 16; Abb. 28).

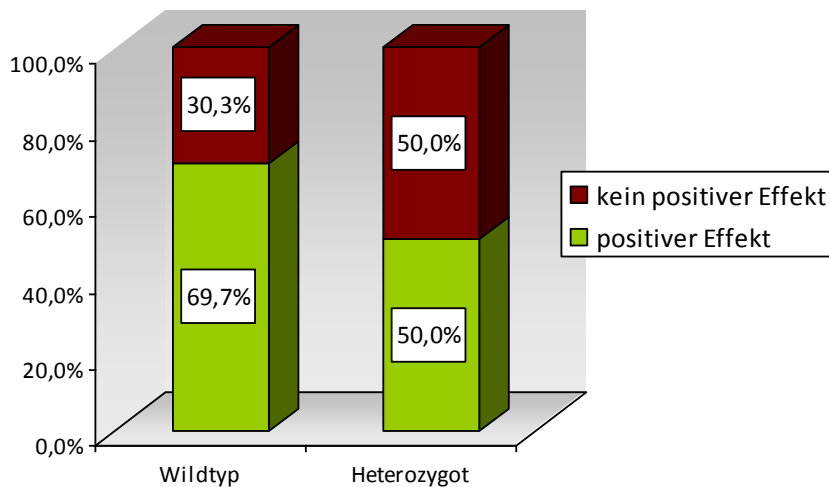


Abbildung 28: Verteilung des therapeutischen Effekts von Azathioprin innerhalb der unterschiedlichen Genotypen bei Patienten mit RA

4.4.3. Genotyp und Leukopenie

Insgesamt entwickelten 12 Patienten eine UAW, davon waren 10 Wildtypträger und 2 heterozygot.

Entsprechend der Zielstellung dieser Arbeit war es vor allem interessant zu untersuchen, welchem Genotyp die Patienten mit und ohne Leukopenie zuzuordnen waren. Von den 5 Patienten mit Leukopenie waren 40 % (2) heterozygot und 60 % (3) Wildtypträger. Von den Patienten, die keine Leukopenie entwickelt hatten, waren 11,4 % (8) heterozygot und 88,6 % (62) Wildtypträger (Tab. 15; Abb. 29).

Es konnte kein statistischer Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer Leukopenie und dem Genotyp gezeigt werden, und dies weder in der gesamten Gruppe (χ^2 -Test, $p = 0,129$) noch für nur RA-Patienten (χ^2 -Test, $p = 0,298$).

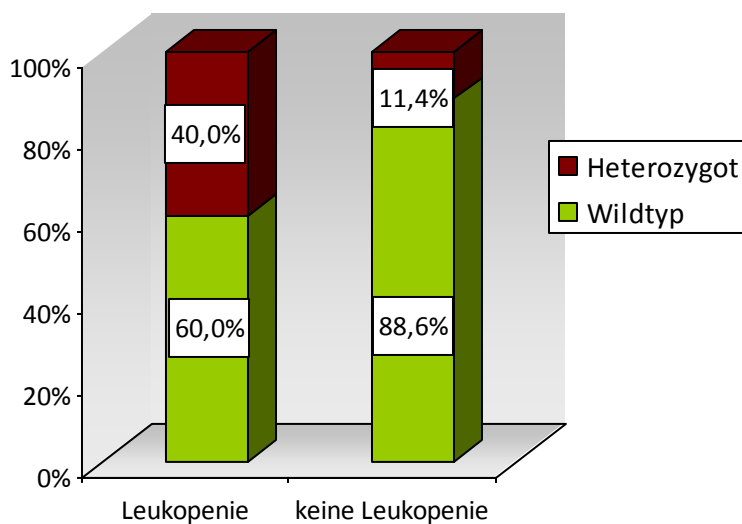


Abbildung 29: Verteilung des Genotyps bei Patienten mit Leukopenie

Es zeigt sich, dass von den 65 Wildtypträgern 4,6 % (3) Patienten eine Leukopenie entwickelten und von den 10 Heterozygoten 20 % (2) (Tab. 15; Abb. 30).

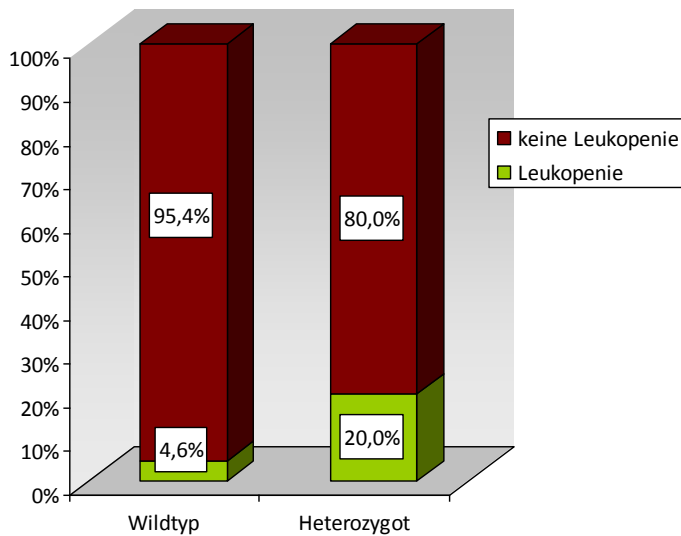


Abbildung 30: Anteil der Patienten mit Leukopenie in Bezug auf den Genotyp

Betrachtet man nur die 37 Patienten mit RA, lässt sich eine ähnliche Verteilung feststellen: 3 Patienten entwickelten eine Leukopenie, davon waren 33,3 % (1) heterozygot und 66,7 % (2) Wildtypträger. Von den Patienten, die keine Leukopenie entwickelt hatten, waren 91,2 % (31) Wildtypträger und 8,8 % (3) heterozygot (Tab. 16; Abb. 31).

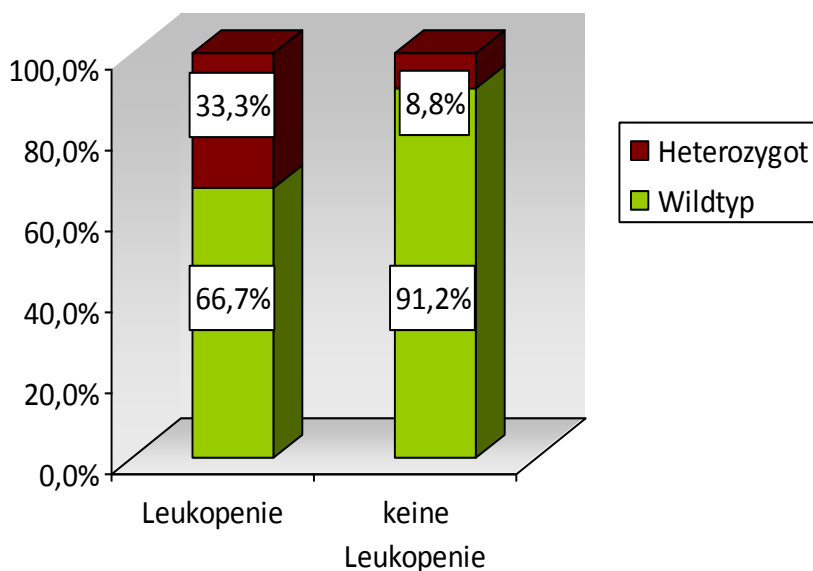


Abbildung 31: Verteilung des Genotyps bei RA-Patienten mit Leukopenie

Das heißt, von den 33 Wildtypträgern entwickelten 4,6 % (2) eine Leukopenie, während bei den 4 heterozygoten 20 % (1) eine Leukopenie entwickelten (Tab. 16; Abb. 32).

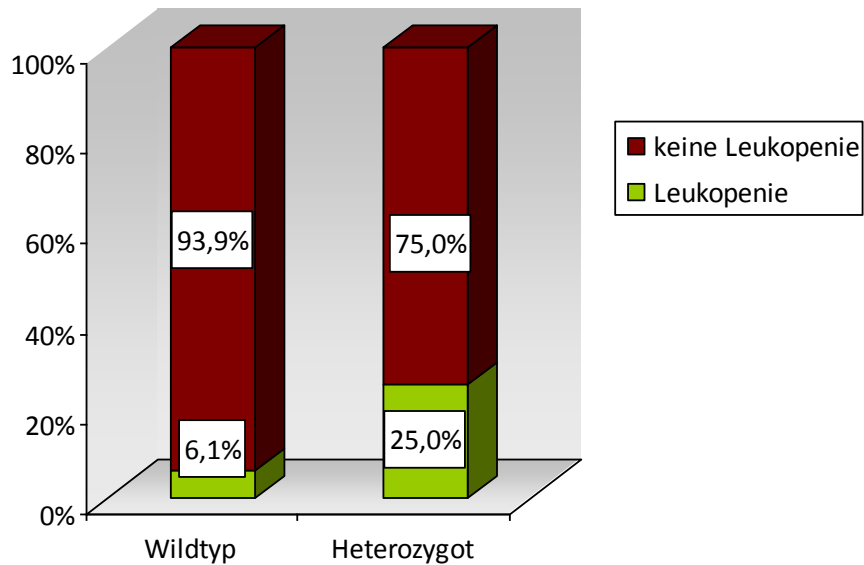


Abbildung 32: Anteil der RA-Patienten mit Leukopenie in Bezug auf den Genotyp

4.7. Einzelfallbeschreibung

Die jeweilige Anzahl Patienten in den „UAW-Gruppen“ ist relativ klein (max. 5 Patienten mit Leukopenie), so dass damit keine validen statistischen Aussagen (gerade in Bezug auf einen Zusammenhang mit dem TPMT-Genotyp) getroffen werden können. Um so interessanter war es daher, die einzelnen Patienten anhand der vorliegenden Anamnese zu analysieren.

4.7.1. Patienten mit Leukopenie

Eine Leukopenie trat insgesamt bei 5 Patienten auf. Bei diesen Patienten betrug die Anwendungsdauer zwischen 4 und 152 Monaten (im Mittel 67 Monate), sie nahmen eine durchschnittliche Azathioprindosis von 2,24 mg/kg KG ein (die geringste Dosis war 1,18 mg/kg KG, die höchste 3,50 mg/kg KG).

3 dieser Patienten litten unter RA, die anderen 2 Patienten hatten SLE (hier kann eine Leukopenie auch krankheitsbedingt auftreten) (Tab. 17).

Patientin 1 war Wildtypträgerin, hatte RA und die Azathioprindosis betrug 1,7 mg/kg KG. Die Patientin wurde zusätzlich mit Prednisolon, Etanercept, Rofecoxib, Risedronat, Calcium und Vitamin D behandelt. Die deutliche Leukopenie (die Leukozytenwerte fielen bis auf 0,9 Gpt/l ab) trat jedoch erst nach der Azathioprin-Einnahme auf, die Therapie mit Azathioprin und Etanercept wurde nach 4 Monaten beendet.

Patientin 2 war heterozygot und trug das 1/3A* Allel. Sie hatte ebenfalls RA und wurde mit einer Dosis von 2,8 mg/kg KG (empfohlene Tageshöchstdosis: 2,5 mg/kg/KG) behandelt, worunter sie nach 35 Monaten eine Leukopenie entwickelte (2,5 Gpt/l). Nach einer Dosisreduktion auf 1,89 mg/kg KG konnte die Therapie bei guter Wirksamkeit und Verträglichkeit fortgesetzt werden. Die Patientin nahm zusätzlich nur Calcium und Vitamin D ein.

Patient 3 war Wildtypträger, hatte RA und nahm zusätzlich nur Rofecoxib ein. Unter einer Azathioprindosis von 2,0 mg/kg KG entwickelte er nach 43 Monaten eine Leukopenie (2,8 Gpt/l), konnte die Therapie jedoch mit reduzierter Dosis (1,33 mg/kg KG) fortsetzen.

Patientin 4 war ebenfalls Wildtypträgerin und hatte SLE. Sie wurde anfänglich mit einer Dosis von 1 mg/kg KG behandelt, die gut vertragen wurde. Nach Zunahme der Krankheitsaktivität wurde die Dosis schrittweise bis zu 3,5 mg/kg KG erhöht (empfohlene Tageshöchstdosis: 2,5 mg/kg/KG), worunter die Patientin nun eine Leukopenie (3,1 Gpt/l) entwickelte. Die Therapie wurde nach insgesamt 65 Monaten abgebrochen. Zusätzlich wurde die Patientin mit Prednisolon und Gabapentin aufgrund einer Epilepsie therapiert.

Patient 5 war heterozygot, trug ebenfalls das 1/3A* Allel und hatte SLE. Er nahm zusätzlich Prednisolon ein und entwickelte nach 27 Monaten unter einer Dosis von 0,88 mg/kg/KG eine Leukopenie mit Werten bis zu 1,6 Gpt/l. Da der Patient im vorherigen Verlauf auch eine höhere Dosis von 1,18 mg/kg/KG gut toleriert hatte, liegt die Vermutung nahe, dass die Leukopenie auch im Rahmen der Grunderkrankung aufgetreten sein könnte.

Dennoch wurde Azathioprin abgesetzt, danach erholten sich die Leukozytenwerte wieder.

Tabelle 17: Patienten mit Leukopenie

Pat-Nr.	Geschlecht	Alter (in Jahren)	Therapiedauer in Monaten	Erkrankung	AZA-Dosis in mg/kg KG	Genotyp	Therapie-Verlauf
1	w	77	4	RA	1,69	1/1	Therapie abgebrochen
2	w	36	152	RA	2,83	1/3A	Therapie mit reduzierter Dosis fortgesetzt
3	m	61	86	RA	2,0	1/1	Therapie mit reduzierter Dosis fortgesetzt
4	w	37	65	SLE	3,56	1/1	Therapie abgebrochen
5	m	62	27	SLE	0,88	1/3A	Therapie abgebrochen

4.7.2. Patienten mit Leberwerterhöhung

Die Patienten mit Leberfermenterhöhung waren alle Wildtypträger, die Werte stiegen maximal bis zum 3 - Fachen des Normwertes an.

In einem von 4 Fällen lag eine ethanoltoxische Belastung vor, einmal blieben die Fermente weiterhin trotz Absetzen von Azathioprin erhöht, einmal normalisierten sich die Leberwerte, obwohl die Azathioprin-Dosis nicht reduziert wurde. Nur in einem Fall wurde ein direkter Zusammenhang mit Azathioprin vermutet und dieses abgesetzt, danach kam es zu einem Rückgang der Werte (Tab. 18).

Tabelle 18: Patienten mit Leberwerterhöhung unter Azathioprin

Geschlecht	Therapie-Dauer in Monaten	Erkrankung	Genotyp	Dosis in mg/kg KG	Therapie-Verlauf
M	18	RA	1/1	1,3	Azathioprin abgesetzt, Leberwerte weiterhin erhöht
M	48	RA	1/1	1,35	Azathioprin fortgesetzt, C2-Abusus
M	5	Morbus Wegener	1/1	0,81	Azathioprin abgesetzt
W	28	RA	1/1	1,56	Azathioprin fortgesetzt

4.7.3. Patient mit Pankreatitis

Bei dem Patienten mit Pankreatitis ist der Zusammenhang mit Azathioprin fraglich, da eine zweite Episode ein Jahr nach Absetzen von Azathioprin auftrat, so dass man einen Steinabgang als Ursache vermutete.

5. Diskussion

Entzündliche rheumatische Erkrankungen kommen in der ärztlichen Praxis häufig vor und können in allen Alterstufen auftreten. Sie führen für die Betroffenen häufig zu einer starken Einschränkung des Alltags und verursachen immer wieder Arbeitsausfälle sowie vorzeitige Berufsunfähigkeit. Gerade entzündliche Gelenkerkrankungen wie die rheumatoide Arthritis sind durch einen chronisch progredienten Verlauf gekennzeichnet, der meist mit einer frühzeitigen Zerstörung der Gelenke einhergeht. Diese kann bereits zu Beginn der Erkrankung einsetzen, so dass ein frühzeitiger Behandlungsbeginn sinnvoll und notwendig ist (Puchner 2010, DGRh 2012).

Zur Therapie der RA stehen unterschiedliche Arzneistoffe zur Verfügung. Zum einen zur symptomatischen Schmerzbehandlung NSAR, zusätzlich aber auch Opiode, zum anderen Immunsuppressiva wie Glucocorticoide, Basistherapeutika und Biologika, die direkt in das Entzündungsgeschehen eingreifen. Mittel der ersten Wahl ist heute laut S1-Leitlinie der DGRh aus dem Jahr 2012 aufgrund der überzeugenden Datenlage zu Wirksamkeit und Sicherheit Methotrexat (DGRh 2012), während von Mitte der 1960er Jahren bis in die 80er Jahre hauptsächlich Azathioprin in der ersten Zeit nach seiner Markteinführung eingesetzt wurde. Der häufige und bevorzugte Einsatz von MTX wird jedoch von vielen Seiten kritisch gesehen, so hat z. B. die amerikanische Regierung eine Empfehlung herausgegeben, MTX aufgrund seiner schweren Nebenwirkungen wie Anämie und Leukopenie, Pneumonitis / Alveolitis sowie Leber- und Nierenschädigung erst bei sehr ernsten Formen der üblichen Indikationen einzusetzen (MedlinePlus 2013). Auch Pagnoux et al. legten in ihrer Vergleichstudie von Azathioprin mit MTX bzgl. Wirksamkeit und Sicherheit bei ANCA-assoziierten Vaskulitiden dar (Pagnoux et al. 2008), dass beide Substanzen als gleichwertig anzusehen sind bzw. sogar ein leichter Vorteil für Azathioprin, insbesondere hinsichtlich der Sicherheit, besteht.

Die Tatsache, dass chronische Arthritiden, die bereits erfolglos mit anderen Basistherapeutika (auch Biologika) behandelt wurden, mit Azathioprin noch in 20 – 30 % der Fälle erfolgreich behandelt werden können, zeigt, dass es sich hier durchaus um eine potente Substanz mit akzeptablem Nebenwirkungsprofil (auch im Vergleich zu MTX) handelt (Hettenkofer 2003). Deshalb hat Azathioprin seinen festen Platz in der Therapie entzündlich rheumatischer Erkrankungen und erlebt hier immer wieder eine Renaissance. Laut S1-

Leitlinie kommt es vor allem bei therapierefraktären Formen der RA, bei denen weder unter MTX noch Biologikatherapie ein Therapieerfolg zu verzeichnen ist, zum Einsatz (DGRh 2012). Nach Fachinformation ist es für die Behandlung der RA in Fällen, in denen die Erkrankung mit anderen Basistherapeutika nicht kontrolliert werden kann, zugelassen und stellt in der Behandlung hochaktiver, progredienter Fälle von SLE mit Organmanifestation ebenfalls das Mittel der Wahl dar (GlaxoSmithKline 2007).

Daneben wird Azathioprin zur Behandlung der akuten lymphatischen Leukämie, zur Vorbeugung von Abstoßungsreaktionen nach Transplantationen und - üblicherweise in Kombination mit Glucocorticoiden – bei mäßig schweren und schweren Verlaufsformen von CED eingesetzt.

Leider ist die Therapie mit Azathioprin genauso wie der Einsatz von Methotrexat durch das Auftreten einiger, zum Teil auch schwerwiegender Nebenwirkungen limitiert. Eine davon ist die Leukopenie, für deren Entstehung bei der Einnahme von Azathioprin ein Zusammenhang mit dem genetischen Polymorphismus der TPMT vermutet wird.

Sollte dieser Zusammenhang, der in einigen Studien beschrieben wurde (Black et al. 1998, Corominas et al. 2003, Kerstens et al. 1995, Schwab et al. 2002, Ansari et al. 2002) tatsächlich vorhanden sein, müsste es möglich sein, durch Genotypisierung vor Azathioprintherapie alle Patienten herauszufiltern, die aufgrund ihres Genotyps eine Leukopenie entwickeln würden. Diese könnte man dann mit einer wesentlich niedrigeren Azathioprinosis behandeln oder ganz von der Therapie ausschließen, wenn ein homozygot defizienter Genotyp gefunden wird. Dieses Vorgehen wird beispielsweise auch in der von der Apotheke des Universitätsklinikum Jena genutzten Arzneimitteldatenbank empfohlen (ifap 2013). Dort kann man unter den Hinweisen und Vorsichtsmaßnahmen zu Azathioprin finden, dass eine Testung auf einen TPMT-Mangel prätherapeutisch, bei hochdosierter Azathioprintherapie oder bei rascher Verschlechterung des Blutbilds stattfinden sollte (ifap 2013). Die TPMT-Genotypisierung wird inzwischen auch von vielen Kliniklaboren und Laborzentren routinemäßig angeboten.

Da Azathioprin als potentes Reservemittel eine wichtige Rolle in der Therapie von Patienten mit rheumatoider Arthritis spielt, wurde in der vorliegenden Arbeit gerade diese Patientengruppe, die in der Literatur bisher kaum separat betrachtet wurde (Black et al. 1998, Corominas et al. 2003), überprüft. Wir untersuchten, ob es tatsächlich einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen dem Genotyp und der Wirksamkeit oder dem

Auftreten einer Leukopenie gibt und ob sich deshalb die Azathioprintherapie durch Genotypisierung sicherer gestalten lässt.

Bisher wurden zu diesem Thema hauptsächlich Studien mit Patienten durchgeführt, die unter CED (Schwab et al. 2002, Ansari et al. 2008, Chevaux et al. 2010, Hindorf et al. 2006, Schedel et al. 2006, Lowry et al. 2001, Dubinsky et al. 2002, Palmieri et al. 2007, Gearry et al. 2003, Colombel et al. 2000, Ansari et al. 2002) oder akuter Leukämie (Evans et al. 2001) litten oder nierentransplantiert (Reuther et al. 2003) waren. Nicht alle Autoren konnten eine direkte Korrelation zwischen TPMT-Genotyp, TPMT-Aktivität und dem Effekt der Azathioprintherapie feststellen, fast alle empfahlen jedoch trotzdem, eine Genotypisierung vor der Therapie durchzuführen, um bei den seltenen homozygot defizienten Patienten die Therapie mit Azathioprin gar nicht erst zu beginnen und diese so vor einer Leukopenie zu bewahren. Bei den Heterozygoten könnte man dann die Therapie mit niedrigeren Dosen beginnen und diese langsam steigern, um auch hier einer Leukopenie vorzubeugen.

Nur sehr wenige Autoren haben sich mit dem Einfluss der TPMT auf die Azathioprintherapie bei Patienten mit entzündlichen rheumatischen Erkrankungen, insbesondere der RA, befasst. Diese Arbeiten lieferten jedoch widersprüchliche Aussagen und sind wegen unterschiedlicher methodischer Ansätze schlecht vergleichbar.

So haben sowohl Kerstens et al. als auch Stolk et al. bei der Bestimmung des Einflusses der TPMT lediglich deren Aktivität bestimmt, nicht jedoch den Genotyp. Diese Daten liefern nur einen Hinweis auf den Einfluss des Genotyps, da keine strenge Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp der TPMT besteht und so nicht immer die richtigen Rückschlüsse auf den Genotyp gezogen werden können. Auch wenn 2 von 3 Patienten (Kerstens et al. 1995), bzw. 1 von 2 (Stolk et al. 1998) mit Leukopenie eine verminderte Enzymaktivität der TPMT zeigten, kann man nicht automatisch davon ausgehen, dass diese Patienten auch einen heterozygoten Genotyp haben, sondern müsste dies mit einer Genotypisierung überprüfen. Beide Studien wurden außerdem mit geringen Patientenzahlen durchgeführt (Stolk: 33 Patienten, Kerstens: 16 Pat), so dass die Aussagekraft nicht sehr hoch ist (Kerstens et al. 1995, Stolk et al. 1998).

Black et al. und Corominas et al. dagegen bestimmten in ihren Studien den Genotyp der Patienten, kamen aber zu unterschiedlichen Ergebnissen, was wahrscheinlich auch wieder mit den kleinen Patientenzahlen zu begründen ist, die die statistische Aussagekraft schmälern. Black et al. sahen in ihrer Studie an 67 Patienten mit entzündlich rheumatischen

Erkrankungen (RA, SLE und andere Erkrankungen) einen deutlichen Zusammenhang zwischen TPMT-Genotyp und Leukopenie unter Azathioprintherapie. Hier erlitten 5 von 6 Heterozygoten eine Leukopenie, während unter den Wildtypträgern keine Leukopenie auftrat (Black et al. 1998). Ein gegensätzliches Ergebnis erzielten dagegen Corominas et al., die ebenfalls den TPMT-Genotyp bestimmten und mit dem Auftreten der Leukopenie in Bezug setzten. In dieser Arbeit wurde kein Zusammenhang zwischen TPMT-Genotyp und alle Heterozygoten entwickelten keine Leukopenie (Corominas et al. 2003). Die Studienpopulation war mit 40 Patienten immer noch relativ klein.

Auch Naughton et al. und Jun et al. konnten keinen Zusammenhang zwischen TPMT-Genotyp und Myelosuppression nachweisen, es wurden jedoch nur Patienten mit SLE untersucht (Naughton et al. 1999, Jun et al. 2005).

Da sich letztendlich bisher nur die zwei Studien von Corominas et al. und Black et al. mit dem Zusammenhang zwischen TPMT-Genotyp und dem Auftreten einer Leukopenie bzw. dem Outcome der Azathioprintherapie bei Patienten mit entzündlich rheumatischen Erkrankungen beschäftigt haben (Black et al. 1998, Corominas et al. 2003), und diese zu konträren Ergebnissen kamen, sollte in dieser Arbeit für unsere Therapieempfehlungen im Universitätsklinikum Jena noch einmal abschließend überprüft werden, ob es tatsächlich eine Korrelation gibt und ob deshalb eine Genotypisierung der Patienten vor Azathioprintherapie sinnvoll wäre, um die Therapie optimal zu gestalten .

Um den postulierten Zusammenhang zu überprüfen, wurde von allen unseren in die Studie einbezogenen Patienten der Genotyp bestimmt und durch gründliche Recherche sowie Auswertung der klinischen Daten und Laborparameter aus den Patientenakten der Effekt der Azathioprintherapie erfasst. Entscheidend war dabei, ob die Therapie wirksam war oder nicht und ob bzw. welche unerwünschten Wirkungen auftraten. Besonderes Augenmerk lag hier auf der Leukopenie. Auch die Azathioprinindosis, Komedikation, Laborparameter sowie Behandlungsdauer bis zum Ende des Beobachtungszeitraums wurden dokumentiert.

5.1. Geschlecht

Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises treten bei Frauen in der Regel häufiger auf als bei Männern. So findet man die RA rund dreimal öfter bei Frauen, an SLE erkranken sogar 9 – 10 mal mehr Frauen (Hettenkofer 2003, Puchner 2010).

Auch in dieser Arbeit waren 68 % aller Patienten weiblich, betrachtet man nur die Untergruppe der SLE-Patienten, betrug der Frauenanteil sogar 87 %. Dies spiegelt die in der Literatur angegebene Verteilung gut wider.

5.2. Genotyp

In der kaukasischen Bevölkerung findet man knapp 89 % Wildtypträger, ca. 11 % Heterozygote und 0,3 % homozygot defiziente Patienten (Weinshilboum und Sladek 1980, Schaeffeler et al. 2004, Yates et al. 1997, Weinshilboum et al. 1999). Für den heterozygoten Genotyp sind 17 Allelvarianten bekannt (Schaeffeler et al. 2004), das TPMT*3A-Allel ist das in der kaukasischen Bevölkerung am häufigsten vorkommende Allel und zusammen mit den Allelen *2 und *3C werden 80 – 95 % der heterozygoten Genotypen abgedeckt (Tai et al. 1997, Otterness et al. 1997). In Afrika und Süd-Ost-Asien ist dagegen das TPMT*3C-Allel häufiger verbreitet (Schaeffeler et al. 2004).

86,7 % der Patienten in dieser Arbeit waren Wildtypträger und 13,3 % heterozygot (Tab. 3). Unter den Patienten mit Mutation trugen 6 Patienten (8,0 %) das *1/*3A-Allel, 2 Patienten (2,7 %) das *1/*3B-Allel und jeweils 1 Patient besaß das *1/*3C und *1/*2 Allel. Die in dieser kleinen Gruppe gefundene Verteilung der Allele bildet somit gut das in der Literatur beschriebene Verhältnis der entsprechenden Genotypen ab (Weinshilboum und Sladek 1980).

Homozygot defiziente Patienten kamen nicht vor, was aufgrund der geringen Patientenzahl auch nicht zu erwarten war.

5.3. Therapiedauer

Um den Einfluss des genetischen Polymorphismus der TPMT auf den Therapieerfolg bei der Behandlung mit Azathioprin zu untersuchen, wurde überprüft, ob der Genotyp insofern einen Einfluss auf die durchschnittliche Therapiedauer hat, dass bspw. bei heterozygoten Patienten die Therapie aufgrund von unerwünschten Wirkungen frühzeitig abgebrochen wird oder entsprechend Wildtypträger von der Therapie so profitieren, dass die Behandlungsdauer deutlich länger ist als bei den Heterozygoten.

Betrachtete man alle Patienten, war in dieser Studie die Behandlungsdauer bei den Wildtypträgern mit 73 Monaten länger als bei den Heterozygoten mit 57 Monaten, was die Vermutung bestätigen würde, dass Wildtypträger mehr von der Therapie profitieren. Die These ließ sich jedoch bei der alleinigen Auswertung der RA-Patienten nicht erhärten. Hier konnte man genau den gegenteiligen Effekt beobachten, da nun die durchschnittliche Therapiedauer bei den Wildtypträgern mit 55 Monaten sogar kürzer (anstatt länger wie bei der Gesamtpopulation) war als bei den Heterozygoten mit 60 Monaten. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Genotyp und Therapiedauer bestand in beiden Gruppen nicht. So konnte hier die Vorstellung nicht bestätigt werden, dass der Genotyp einen Einfluss auf die Therapiedauer hat.

Auch Colombel et al. konnten keinen Unterschied zwischen Heterozygoten und Wildtypträgern bzgl. der Therapiedauer feststellen. Sie untersuchten in ihrer Studie eine Gruppe von Patienten mit Morbus Crohn. Die Therapiedauer reichte hier von 1 bis 87 Monaten. Lediglich bei den 4 homozygot defizienten Patienten ereignete sich die Myelosuppression bereits kurz nach Therapiebeginn (innerhalb 1,5 Monaten)(Colombel et al. 2000). Naughton et al. konnten ebenfalls keine Korrelation zwischen dem Genotyp und der Dauer bis zum Auftreten einer Leukopenie feststellen (Naughton et al. 1999). Bei Black et al. dagegen war die Dauer der Therapie bei Wildtypträgern signifikant länger (Black et al. 1998).

Während die Studie von Black et al. darauf hindeutet, dass bei Heterozygoten durch eine geringere Aktivität der TPMT die Toxizität von Azathioprin zunimmt und durch die so entstehenden Nebenwirkungen die Therapie in der Regel eher abgebrochen wird, lässt sich dies mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit sowie den Resultaten von Colombel et al. und Naughton et al. nicht bestätigen. Gerade die Tatsache, dass in dieser Studie der RA-Patient mit Leukopenie, der die längste Behandlungsdauer hatte, heterozygot war, während der Patient mit Leukopenie und kürzester Behandlungsdauer (4 Monate) Wildtypträger war (Tab. 7), zeigt, dass der Genotyp alleine bezüglich der Therapiedauer (und damit auch bezüglich Wirksamkeit oder dem Auftreten einer Leukopenie oder anderen UAW) keine verlässliche Aussage erlaubt.

5.4. Azathiopridosis

Da man davon ausgeht, dass Patienten mit heterozygotem Genotyp eine niedrigere TPMT-Aktivität aufweisen als Wildtypträger, ist zu vermuten, dass bei diesen Patienten im Vergleich zu den Wildtypträgern bereits bei niedrigerer Azathiopridosis ein positiver therapeutischer Effekt erzielt wird oder dass schon bei niedrigen Dosierungen eine Leukopenie auftritt. Deshalb wurde in dieser Arbeit überprüft, ob es einen Zusammenhang zwischen Genotyp und durchschnittlich eingesetzter Azathiopridosis gibt, so dass es eine Genotypisierung der Patienten erlauben würde, die Therapie gleich mit der optimalen Dosis zu beginnen, anstatt sich einschleichend und mit regelmäßigen Blutbildkontrollen an das Therapieoptimum heranzutasten.

Die Patienten unserer Studie wurden mit einer durchschnittlichen Azathiopridosis von 1,74 mg/kg KG therapiert (Tab. 8). RA-Patienten erhielten dagegen im Mittel etwas niedrigere Dosen (1,72 mg/kg KG), SLE-Patienten im Mittel die höchsten Dosen (1,87 mg/kg KG) (Tab. 8). Insgesamt therapierte man durchschnittlich mit leicht unter der bei rheumatischen Erkrankungen in der Fachinformation empfohlenen Dosis von 2 – 3 mg/kg KG (GlaxoSmithKline 2007). Betrachtet man die Zahlen genauer, zeigen sich jedoch große Schwankungen (von 0,67 mg/kg KG bis 3,5 mg/kg KG), so dass es aufschlussreicher ist, die Dosis im Zusammenhang mit dem Genotyp und dem Outcome zu betrachten.

Dabei erkennt man, dass bei den Patienten mit positivem Effekt Wildtypträger durchschnittlich mit einer niedrigeren Dosis behandelt wurden als Heterozygote (1,72 mg/kg KG versus 1,79 mg/kg KG), während eine Leukopenie bei den Wildtypträgern erst unter einer höheren Dosis auftrat als bei den Heterozygoten (2,4 mg/kg KG versus 1,86 mg/kg KG) (Tab. 12).

Diese Ergebnisse sind widersprüchlich im Hinblick auf die Aussagekraft einer Genotypisierung der TPMT. Einen positiven Effekt würde man bei Wildtypträgern erst unter einer höheren Dosis als bei Heterozygoten erwarten, da bei einer höheren TPMT-Aktivität weniger der wirksamen 6-TGN gebildet werden und somit höhere Dosen für einen positiven Effekt nötig wären. Gleichzeitig würde das auch bedeuten, dass Heterozygote bereits bei niedrigerer Azathiopridosis eine Leukopenie entwickeln als Wildtypträger. In dieser Untersuchung zeigt sich jedoch genau das Gegenteil des erwarteten Effekts hinsichtlich einer positiven Wirkung, während die Annahme bzgl. einer Leukopenie bestärkt wird, so dass auch hier keine verlässliche Voraussage getroffen werden kann.

In der Literatur findet sich nur die Arbeit von Naughton et al., die den Zusammenhang zwischen Azathiopridosis und Genotyp in ähnlicher Weise an Patienten mit SLE untersucht hat. In dieser Arbeit wurde ebenfalls kein Zusammenhang zwischen Azathiopridosis, Genotyp und Outcome festgestellt (Naughton et al. 1999), so dass in Zusammenschau mit den Ergebnissen dieser Arbeit eine Genotypisierung zur Auswahl einer geeigneten „Startdosis“ oder zur Dosisoptimierung nicht empfohlen werden kann.

5.5. Outcome

Entscheidend für den Patienten ist, dass das für ihn ausgewählte Arzneimittel auch einen positiven Einfluss auf das Krankheitsgeschehen hat und dass das Nutzen-Risiko-Verhältnis akzeptabel ist. Um festzustellen, ob die Therapie mit Azathioprin auch effektiv war und welche unerwünschten Wirkungen in welcher Häufigkeit auftraten, wurde zunächst die Anzahl und Art der unerwünschten Wirkungen sowie ein positiver therapeutischer Effekt oder das Bestehen von Wirkungslosigkeit bestimmt. Diese Ereignisse wurden unter dem Begriff Outcome zusammengefasst.

Insgesamt zeigte sich bei 78,7 % der Patienten ein positiver therapeutischer Effekt der Azathioprintherapie, nur bei 5,3 % wurde die Therapie wegen Wirkungslosigkeit abgebrochen. 12 Patienten (16 %) entwickelten eine UAW (Abb. 11; Tab. 10), darunter waren 5 Patienten mit Leukopenie (6,7 % aller Patienten). 3 dieser Patienten hatten RA, die anderen beiden SLE.

Diese Zahlen bewegen sich in einem ähnlichen Rahmen wie in anderen Studien, bei denen die UAW-Rate ebenfalls bei rund 20 % oder sogar noch höher lag. So fanden Palmieri et al. sowie Ansari et al. rund 20 % UAW bei Patienten mit CED (Palmieri et al. 2007, Ansari et al. 2002), bei Palmieri et al. wurde bei 72 % ein positiver therapeutischer Effekt beobachtet, in der Studie von Ansari et al. waren es sogar 79 % der Patienten.

Dagegen konnten Black et al., die ihre Untersuchungen an RA-Patienten vornahmen, nur bei 54 % der Patienten einen positiven Effekt feststellen und mit 37 % war die UAW-Rate deutlich höher als in der vorliegenden Arbeit, wobei ähnlich wie in dieser Arbeit 6 % der Patienten eine Leukopenie entwickelt hatten (Black et al. 1998). Bei Reuther et al. und Ansari et al. wurden dagegen nur in 1,9 % bzw. 1,8 % Leukopenien gefunden. Da Reuther et

al. nierentransplantierte Patienten untersuchten, ist ein direkter Vergleich schwierig (Ansari et al. 2002, Reuther et al. 2004).

5.6. Outcome und Genotyp

Die gängige Vorstellung zum Metabolismus von Azathioprin ist die, dass ein heterozygoter Genotyp der TPMT deren Aktivität vermindert, was letztendlich dazu führen soll, dass vermehrt 6-TGN gebildet werden. Die Folge davon wäre zum einen , dass eine Wirkung bereits bei geringerer Dosis eintritt, zum anderen aber auch, dass gleichzeitig durch die erhöhte 6-TGN die Toxizität steigt und damit auch die Gefahr, eine Leukopenie zu entwickeln.

Um festzustellen, ob diese Vorstellung realistisch ist und sich in der klinischen Praxis widerspiegelt, wurde in dieser Arbeit analysiert, ob es einen statistischen Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer Leukopenie bzw. eines positiven Effekts und dem Genotyp gibt.

Es zeigte sich, dass unter den Heterozygoten weniger Patienten einen positiven Effekt aufwiesen als bei den Wildtypträgern (70 % versus 80 %), dafür jedoch mehr Patienten Wirkungslosigkeit (10 % gegen 4,6 %) und Leukopenie (20 % gegen 4,6 %) (Tab. 15). Auch bei den RA-Patienten war unter den Heterozygoten der Anteil an Patienten mit Leukopenie (25 % versus 6,1 %) und Wirkungslosigkeit (25 % gegen 9,1 %) höher als bei den Wildtypträgern und der Anteil der Patienten mit positivem Effekt ist bei den Heterozygoten geringer als bei den Wildtypträgern (50 % versus 69,7 %) (Tab. 16).

Ein statistischer Zusammenhang zwischen Genotyp und positivem Effekt ließ sich jedoch nicht nachweisen (χ^2 - Test; $p = 1,0$) und sowohl bei den Wildtypträgern als auch bei den Heterozygoten konnte bei den meisten Patienten ein positiver Effekt festgestellt werden (80 % und 70 %) (Tab. 15). Erwartet hätte man jedoch, dass bei den Wildtypträgern der Anteil der Patienten mit positivem Effekt höher ist als bei den Heterozygoten, während hier eine höhere Anzahl an Leukopenien auftreten sollte (siehe unten).

Auch wenn man nur die Patienten mit RA betrachtet, lässt sich kein statistischer Zusammenhang zwischen Genotyp und positivem Effekt nachweisen (χ^2 - Test; $p = 1,0$) und auch hier war sowohl unter den Wildtypträgern wie unter den Heterozygoten der Anteil der

Patienten mit positivem Effekt relativ hoch (70 % der Wildtypträger und 50 % der Heterozygoten) (Tab. 16).

Zwischen dem Auftreten einer Leukopenie und dem Genotyp gab es weder in der gesamten Untersuchungspopulation (χ^2 -Test, $p = 0,129$) noch für RA-Patienten (χ^2 -Test, $p = 0,298$) einen statistischen Zusammenhang.

Unter den Heterozygoten hatten mehr Patienten als bei den Wildtypträgern eine Leukopenie (20 % gegen 4,6 %), was die Annahme unterstützt, dass Patienten mit heterozygotem Genotyp ein höheres Risiko haben, eine Leukopenie unter Azathioprintherapie zu entwickeln. Man würde jedoch auch erwarten, dass fast alle oder zumindest ein relativ hoher Anteil der heterozygoten Patienten eine Leukopenie bekommen. Dies war hier nicht der Fall, nur 20 % der Heterozygoten hatten eine Leukopenie. Diese Aussagen sind jedoch mit Vorsicht zu interpretieren, da insgesamt nur 5 Patienten eine Leukopenie zeigten. Deshalb sollen diese Patienten anschließend noch einmal gesondert betrachtet werden (siehe 4.7. und 5.7.).

Für die Patienten mit RA bot sich das gleiche Bild wie für das gesamte Kollektiv. Es hatten zwar mehr Heterozygote als Wildtypträger eine Leukopenie (25 % gegen 6,1 %), aber innerhalb der Heterozygoten war der Anteil der Patienten mit Leukopenie relativ gering (25 %).

Betrachtet man nun noch einmal nur die Patienten mit Leukopenie, waren insgesamt lediglich 40 % (2) heterozygot, von den Patienten mit RA waren es sogar nur 33,3 % (1 von 3). Dieser Anteil ist relativ gering, so dass man vermuten kann, dass nicht allein der TPMT-Genotyp des Patienten für das Auftreten einer Leukopenie verantwortlich ist. Auch hier ist aufgrund der geringen Patientenzahl eine statistische Aussage kaum möglich, so dass die Einzelfallbetrachtung hilfreicher erscheint (siehe 4.7. und 5.7.).

Die sich in der vorliegenden Arbeit abzeichnende Tendenz war auch in der Studie von Palmieri et al. zu erkennen, die an Patienten mit CED durchgeführt wurde und in der ebenfalls nur 26 % der Patienten heterozygot waren. Auch dort kam man zu dem Schluss, dass der Genotyp nicht die hauptsächliche Ursache für eine Leukopenie sein kann.

Andere Autoren stellten ebenfalls fest, dass die TPMT zwar wichtig für den Thiopurin-Stoffwechsel ist, aber nicht der einzige eine Knochenmarksuppression auslösende Faktor sein kann. So ereigneten sich auch in diesen Studien zwischen 50 % und 75 % der

Leukopeniefälle unter Thiopurintherapie bei Wildtyp-Patienten (Duley und Florin 2005, Ansari et al. 2002, Colombel et al. 2000).

Black et al., die 1998 die erste Arbeit veröffentlicht hatten, die sich mit dem Zusammenhang von TPMT-Genotyp und Myelotoxizität unter Azathioprin bei Patienten mit rheumatischen Erkrankungen befasst hatte, fanden dagegen einen deutlichen Zusammenhang zwischen Genotyp und Leukopenie, da bei 5 von 6 heterozygoten Patienten die Thiopurintherapie innerhalb eines Monats wegen reduzierter Leukozytenzahl abgebrochen worden war, während bei den Wildtypträgern keine hämatologischen Abnormalitäten festgestellt wurden. Auch war die Therapiedauer bei Wildtypträgern signifikant länger als bei Heterozygoten. Leberwerterhöhungen schienen jedoch in keinem Zusammenhang mit dem Genotyp zu stehen (Black et al. 1998). Deshalb wird hier eine Genotypisierung empfohlen, um Patienten mit erhöhtem Nebenwirkungsrisiko identifizieren zu können.

Auch bei Schwab et al. waren 2 der 5 Patienten mit Leukopenie heterozygot, ein Patient sogar homozygot defizient mit kaum messbarer TPMT-Aktivität. Bei den beiden heterozygoten Patienten wurde auch eine intermediäre TPMT-Aktivität gemessen, während die anderen beiden Patienten mit Leukopenie Wildtypträger waren und normale TPMT-Aktivität zeigten. Bei einem dieser Wildtyp-Patienten fand sich eine Komedikation mit Mesalazin sowie das Bestehen einer Epstein-Barr-Virus-Infektion, so dass die Leukopenie vermutlich dadurch ausgelöst worden war oder zumindest als verantwortliche Mitursache diskutiert werden muss. Schwab et al. kommen zu dem Schluss, dass aus diesen Daten deutlich hervorgeht, dass homozygot-defiziente Patienten ein hohes Risiko haben, eine Leukopenie zu entwickeln und deshalb eine routinemäßige Genotypisierung eingeführt werden sollte, um eben diese homozygot-defizienten Patienten herauszufiltern und somit eine Myelosuppression zu vermeiden. Auch soll die Genotypisierung die Auswahl der geeigneten Azathioprin-Dosis (Erreichen eines klinischen Effekts, ohne ein UAW zu verursachen) erleichtern (Schwab et al. 2002). Dabei ist letztendlich nicht klar, ob eine Dosiserniedrigung bei Heterozygoten generell nötig ist, da auch in der Studie von Schwab et al. 5 der 7 Heterozygoten erfolgreich mit Standarddosierungen behandelt wurden (2 mg/kg KG) (Schwab et al. 2002) und keine Myelosuppression zeigten. Bei drei dieser heterozygoten Patienten wurde auch eine normale TPMT-Aktivität gemessen.

Vor dem Hintergrund, dass bei Schwab et al. 5 der 7 Heterozygoten erfolgreich und ohne UAW mit der Standarddosierung behandelt werden konnten, ist die Schlussfolgerung nach

einer Genotypisierung nur insofern nachvollziehbar, dass homozygot-defiziente Patienten von der Therapie ausgeschlossen werden können. Für alle anderen ist der Nutzen zu hinterfragen, gerade auch in Zusammenschau mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie. Da all diese Studien mit relativ kleinen Patientenzahlen durchgeführt wurden, ist es hilfreich, sich die Metaanalyse von Higgs et al zu betrachten, die 67 Studien umfasst. Hier wurden insgesamt 655 Fälle einer Myelosuppression ermittelt, an denen untersucht wurde, ob es eine Korrelation zum Genotyp gibt. Dabei zeigte sich, dass 68,5 % dieser Patienten Wildtypträger waren, so dass davon auszugehen ist, dass die TPMT-Aktivität nicht mit dem Genotyp korreliert (Higgs et al. 2010). Dieses Resultat konnte auch in der vorliegenden Arbeit wieder gespiegelt werden.

5.7. Einzelfälle

Da das Patientenkollektiv in unserer Studie relativ klein war, ist die statistische Aussagekraft der vorliegenden Ergebnisse mit Vorsicht zu bewerten. Deshalb werden die Patienten mit Leukopenie noch einmal einzeln betrachtet. Würde der Genotyp eine Vorhersage bzgl. der Entstehung einer Leukopenie erlauben, müssten der größte Teil dieser Patienten heterozygot sein und sich die Leukopenie bereits kurz nach Beginn der Azathioprintherapie bei relativ niedriger Dosis (deutlich unter den Therapieempfehlungen) entwickeln.

Hier waren jedoch 3 von 5 der Patienten (also mehr als 50 %) mit Leukopenie Wildtypträger. Bei Patient 5 würde man vermuten, dass der Genotyp ausschlaggebend für die Leukopenie war. Er litt unter SLE, war heterozygot, entwickelte bei einer niedrigen Azathioprin-Dosis (0,88 mg/kg KG) eine Leukopenie und die Therapie wurde im Anschluss abgebrochen. Gegen den Genotyp als Ursache spricht jedoch, dass der Patient die Leukopenie erst nach 27 Monaten Therapiedauer entwickelt hatte und in der vorherigen Behandlungsphase auch eine höhere Dosis (1,18 mg/kg KG) gut toleriert hat, so dass davon auszugehen ist, dass die Leukopenie am ehesten durch die Grunderkrankung ausgelöst wurde. Die Therapie mit Azathioprin wurde vorsichtshalber beendet.

Auch bei Patientin 1 hätte die Genotypisierung keine verlässliche Vorhersage bezüglich der Leukopenie erlaubt, da diese als Wildtypträgerin bereits nach 4 Monaten bei relativ niedriger Dosierung (1,69 mg/kg KG) eine Leukopenie entwickelte. Die Therapie wurde abgebrochen. Hätte man vor Therapiebeginn eine Genotypisierung durchgeführt, wäre die

Patientin mit einer Standarddosis Azathioprin behandelt worden und hätte dann unerwartet eine Leukopenie entwickelt.

Patientin 2 ist heterozygot und entwickelte erst nach 152 Monaten bei einer relativ hohen Dosis von 2,83 mg/kg KG die Leukopenie. Die Therapie konnte mit niedrigerer Dosis wieder fortgesetzt werden. Bei dieser Patientin hätte die Genotypisierung ebenfalls eine falsche Vorhersage ausgelöst, da man Azathioprin deutlich niedriger dosiert und damit die Patientin nicht von der Therapie profitiert hätte. Die eingetretene Leukopenie war hier eher ein Zeichen für eine Überdosierung.

Ebenso entwickelte Patient 3 die Leukopenie erst nach längerer Zeit und die Therapie konnte mit niedrigerer Dosis fortgesetzt werden. Da er Wildtypträger war, hätte man bei ihm nicht vermutet, dass er eine Leukopenie bereits unter einer „Standarddosis“ von 2 mg/kg KG entwickelt und dies möglicherweise übersehen, wäre er genotypisiert worden.

Bei Patientin 4 ist von einer „gewöhnlichen“ Überdosierung auszugehen. Sie ist auch Wildtypträgerin und hatte zu Beginn die Therapie mit niedriger Dosis gut vertragen. Erst bei erneuter Krankheitsaktivierung und nach Dosiserhöhung auf 3,56 mg/kg KG hat sich die Leukopenie nach 65 Monaten Behandlungsdauer entwickelt.

Diese fünf Fallbeispiele zeigen, dass sich durch Genotypisierung alleine der Effekt der Azathioprintherapie nicht vorhersagen lässt und engmaschige Blutbildkontrollen trotzdem weiter nötig sind. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Ergebnissen aus anderen Studien.

Naughton et al. fanden bei einer Untersuchung an Patienten mit SLE ebenfalls, dass zwar das Vorkommen des TPMT-Polymorphismus eine Neutropenie verursachen könnte, dass aber nicht alle Neutropenien durch den TPMP-Polymorphismus vorhergesagt werden können. Als Ursache dafür wird angegeben, dass auch noch andere Faktoren bei ihrer Entstehung eine Rolle spielen, wie z.B. die Grunderkrankung, Komedikation, Geschlecht und Alter. Auch ist die TPMT nicht das einzige Enzym, das beim Metabolismus von Azathioprin eine Rolle spielt (Naughton et al. 1999) und es ist noch ungeklärt, welche Bedeutung den anderen Enzymen beim Azathioprinstoffwechsel zukommt (siehe 5.9.).

Dass der Genotyp nicht alleine für die Entstehung einer Leukopenie verantwortlich ist, wurde auch in anderen Studien gezeigt, so z. B. bei Colombel et. al., wo von den 41 Morbus-Crohn-Patienten mit Myelotoxizität lediglich 11 Patienten (27 %) heterozygot, die restlichen 73 % dagegen Wildtypträger waren. Auch hier vermuten die Autoren, dass es noch andere

Ursachen für die Myelosuppression gibt. Trotzdem kamen die Autoren zu der Schlussfolgerung, dass eine Genotypisierung sinnvoll sei, um zum einen diejenigen Patienten herauszufinden, die homozygot-defizient sind und mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Myelosuppression erleiden und um zum anderen bei heterozygoten Patienten die Therapie mit anfänglich sehr niedriger Dosierung einzuleiten (Colombel et al. 2000). Zusätzlich zur Genotypisierung wäre außerdem die Phänotypisierung sinnvoll, um den metabolischen Status genauer bestimmen zu können. Die Phänotypisierung ist jedoch zeitaufwändig und es gibt einige erhebliche Einschränkungen. So kann das Ergebnis der Bestimmung der TPMT-Aktivität durch eine vor kurzem erfolgte Bluttransfusion noch bis zu 120 Tage (Lebensdauer der Erythrozyten) verfälscht sein, da auch die Aktivität der TPMT der Spender – Erythrozyten mit bestimmt wird. Auch kann die Thiopurintherapie selbst die TPMT-Aktivität um bis zu 20 % erhöhen, wobei der Mechanismus noch unklar ist. Ferner gibt es einige Arzneimittel, die als potente Hemmstoffe der TPMT gelten, so dass sie auch den klinischen Erfolg der Azathioprintherapie beeinflussen und so z. B. das Leukopenierisiko erhöhen (Schaeffeler et al. 2004).

Darüber hinaus sind am Azathioprinstoffwechsel neben der TPMT noch weitere Enzyme beteiligt, so dass neben den 6-TGN noch andere Produkte entstehen, die ebenfalls zur Toxizität beitragen können. Die Schlussfolgerung ist, dass durch Genotypisierung die homozygot Defizienten, die auf keinen Fall Azathioprin erhalten sollten, gleich erkannt werden, ebenso wie die Heterozygoten, bei denen die Azathioprintherapie besonders vorsichtig durchgeführt werden sollte. Trotz der Genotypisierung ist jedoch ein regelmäßiges Monitoring der Blutwerte weiterhin nötig (Colombel et al. 2000).

Obwohl auch Ansari et al. in ihrer Studie an Patienten mit CED feststellten, dass der TPMT-Phänotyp nicht alleine der Grund für eine Neutropenie sein kann, konnte eine direkte Korrelation zwischen TPMT-Aktivität und Wirksamkeit festgestellt werden. Je höher die Aktivität der TPMT, desto geringer war die Chance auf eine komplette Remission. Auch hier sprechen sich die Autoren für eine Geno- und Phänotypbestimmung vor Therapiebeginn aus, um die Therapie in Bezug auf Wirkung und Wechselwirkung zu optimieren (Ansari et al. 2002).

Auch in der Arbeit von Reuther et al. konnte kein Zusammenhang festgestellt werden, wobei die Arbeit aufgrund der kleinen Patientenzahlen nicht so aussagekräftig ist. Von 52

Patienten trat nur bei einem eine Leukopenie auf, dieser Patient war Wildtypträger (Reuther et al. 2004).

Wie die vorliegende Arbeit und die oben genannte Studien zeigt, gibt es keinen (statistisch signifikanten) Zusammenhang zwischen dem TPMT-Genotyp und dem Effekt (Wirksamkeit, Leukopenie) der Azathioprintherapie. So würden viele Myelosuppressionen nicht vorausgesehen werden, da die Patienten Wildtypträger sind, während andere Patienten nicht von der Therapie profitieren würden, da sie heterozygot sind und somit nicht oder mit zu niedriger Dosis therapiert würden. Es scheint außerdem eine große Variabilität der TPMT-Aktivität innerhalb des gleichen Genotyps zu geben, was die Vorhersagbarkeit der Ereignisse weiter erschwert (Chevaux et al. 2010). Auch Ahsen et al. kommen zu dem Schluss, dass durch Genotypisierung die große interindividuelle Variabilität der TPMT-Aktivität nicht widerspiegelt wird (Shipkova und Ahsen 2003). So fanden sie bei Heterozygoten eine Aktivität von 9 bis 30 mmol/(mL Erythrozyten*h), die durch zusätzliche genetische und epigenetische Faktoren bedingt ist.

Die oben genannten Ergebnisse lassen erkennen, dass man durch den Polymorphismus der TPMT nur einen Teil der Wirkungen und Nebenwirkungen (hauptsächlich die Leukopenie) erklären kann und so eine Genotypisierung kritisch zu hinterfragen ist.

Die Ergebnisse legen auch die Schlussfolgerung nahe, dass noch weitere Mechanismen an der Entstehung der Leukopenie beteiligt sind. So scheint es noch zusätzliche Einflüsse auf die Aktivität der TPMT zu geben und es ist kritisch zu hinterfragen, ob wirklich nur die 6-TGN eine Rolle für die Wirksamkeit und Toxizität spielt, oder ob nicht auch andere Azathioprinmetaboliten hierfür relevant sind. Auf diese wichtigen Fragen soll im Folgenden kurz eingegangen werden.

5.8. Toxische Metaboliten

Möglicherweise tolerieren Patienten mit niedrigerer oder fehlender TPMT-Aktivität im Vergleich zu Patienten mit normaler TPMT-Aktivität höhere 6-TGN-Konzentrationen, weil stattdessen die Konzentration an MMPN (Abb. 5), das ebenfalls zytotoxisch wirkt, niedriger ist (Shipkova und Ahsen 2003, Berg und Ford 2010). So führt z. B. eine Steigerung der 6-MP - oder Azathioprinindosis bei Patienten mit CED nicht zu einem entsprechenden Anstieg der 6-TGN-Konzentration in den Erythrozyten, sondern zu einer Überproduktion von 6-MMPN,

was mit Therapieversagen und gesteigerter Hepatotoxizität einhergeht. Weder die mittleren 6-TGN-Level noch die 6-MMPN-Level korrelierten mit dem Vorkommen einer Leukopenie und es konnte auch kein Zusammenhang mit der TPMT festgestellt werden (Dubinsky et al. 2002).

Auch Coulthard et al. zeigten, dass die Toxizität von Azathioprin durch die Konzentration von MMPN bestimmt wird. Eine Erhöhung der TPMT-Aktivität reduzierte auf der einen Seite den Einbau der 6-TGN in die DNA (aufgrund erniedrigter Substratmenge), steigerte aber auf der anderen Seite die Menge an MMPN und in gleichem Maß die Hemmung der Purin-de-novo-Synthese (durch vermehrten Einbau von MMPN in die DNA). Es scheint also so zu sein, dass eine erniedrigte TPMT-Aktivität die Konzentration an 6-TGN erhöht, gleichzeitig aber die Menge an MMPN sinkt, so dass es im Endeffekt zu keiner erhöhten Toxizität kommt (Coulthard et al. 2002).

Sehr interessant ist in dieser Hinsicht die Arbeit von Hindorf et al., in der der Zusammenhang zwischen TPMT-Genotyp und -Phänotyp bei CED-Patienten untersucht wurde. In dieser Arbeit stellte man ebenfalls fest, dass es keinen direkten Zusammenhang gibt, da heterozygote Patienten eine „normale“ TPMT-Aktivität zeigten (wie sie für Wildtypträger angenommen wird), Wildtypträger dagegen eine so niedrige TPMT-Aktivität aufwiesen, wie man sie eigentlich für heterozygote Patienten vermutet (Hindorf et al. 2006). In dieser Studie konnte für alle Patienten eine signifikante Abnahme der TPMT-Genexpression unter Thiopurintherapie dargestellt werden. Bei den Patienten mit Nebenwirkungen zeigte sich ein Trend zur Zunahme der 6-TGN und MMPN-Konzentration (nicht signifikant), während bei Patienten ohne Nebenwirkungen eher eine Abnahme von MMPN zu verzeichnen war. Beim Test auf Faktoren, die Einfluss auf die Myelotoxizität haben könnten, fand sich ein direkter Zusammenhang nur für die Konzentration an MMPN, nicht dagegen für die Konzentration der 6-TGN sowie den Genotyp oder die Aktivität der TPMT. Genauso zeigte sich für Geschlecht, Grunderkrankung und die Behandlung mit Steroiden oder Aminosalicylaten kein Zusammenhang zum Auftreten der Myelotoxizität. Hindorf et al. beschrieben auch, dass bei Heterozygoten höhere 6-TGN-Konzentrationen gemessen wurden als bei Wildtypträgern und, dass Patienten mit TPMT-Defizienz, die zur Vermeidung der Myelotoxizität mit niedrigen Thiopurin-Dosen behandelt wurden, kein MMPN bilden und deshalb höhere Dosen an 6-TGN tolerieren als Patienten mit normaler TPMT-Aktivität (Hindorf et al. 2006).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass an der Entstehung einer Myelotoxizität MMPN maßgeblich mit beteiligt ist, 6-TGN dagegen eine geringere Rolle spielen.

5.9. Zusätzliche am Azathioprinstoffwechsel beteiligte Enzyme

Wie oben beschrieben, scheint die TPMT bzw. deren Aktivität oder Genotyp nicht allein ausschlaggebend zu sein für das Resultat der Azathioprintherapie. Angesichts des komplexen Azathioprinstoffwechsels liegt diese Schlussfolgerung nahe. So sind neben der TPMT am Azathioprinmetabolismus noch die HGPRT, XO und IMPDH sowie die ITPase und GMPS beteiligt (Abb. 5). Für HGPRT, XO und IMPDH sind ebenfalls unterschiedliche Aktivitäten oder sogar Polymorphismen bekannt, so dass es wahrscheinlich ist, dass sie ebenfalls am Zustandekommen der unterschiedlichen Therapieresultate verantwortlich sind und somit ein sehr komplexes, allein schon genetisch multifaktoriell bedingtes Bild entsteht. Deshalb soll ihr Einfluss auf den Azathioprinstoffwechsel bzw. das Therapieergebnis kurz beleuchtet werden.

5.9.1. Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT)

Ein potenziell entscheidendes Enzym ist die HGPRT, von der ebenfalls Mutationen bekannt sind. Einige dieser Mutationen führen zur Inaktivierung des Genes und damit zu einer zellulären Resistenz gegen die Thiopurintherapie (Shipkova und Ahsen 2003). Einen abnormen Metabolismus der Purine findet man zum Beispiel auch beim Lesch-Nyhan-Syndrom, das aufgrund eines Fehlens der HGPRT entsteht und zu einem starken Anstieg von Harnsäure führt. Deshalb haben Palmieri et al. untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen den verschiedenen Genotypen der HGPRT und dem Auftreten einer Leukopenie oder anderen Nebenwirkungen gibt. Dieser Zusammenhang ließ jedoch nicht nachweisen. Er besteht auch nicht für die TPMT und für die ITPase (Palmieri et al. 2007).

5.9.2. Xanthinoxidase (XO)

Die XO kann bis zu 60 % der 6-MP-Menge metabolisieren, so dass eine verminderte Aktivität das Gleichgewicht zugunsten des Abbaus über die HGPRT verschiebt. Dies führt letztendlich

zu einer erhöhten Konzentration an 6-TGN und damit auch zu erhöhter Toxizität. Bei Patienten mit hoher Aktivität kann es dagegen zu einer reduzierten Wirksamkeit kommen (Chevaux et al. 2010). Ein Mangel an XO ist selten, dafür gibt es große interindividuelle Unterschiede (bis zum 10 - fachen) in der XO-Aktivität. Der Einfluss der unterschiedlichen XO – Aktivität auf die Myelosuppression ist schon deshalb wahrscheinlich, weil bei gleichzeitiger Gabe von Allopurinol, das die XO hemmt, die Zytotoxizität von Azathioprin stark ansteigt. Das Ausmaß der Auswirkung der unterschiedlichen XO-Aktivität auf die Thiopurintherapie ist jedoch schwer einzuschätzen, so dass noch weitere Untersuchungen nötig sind (Berg und Ford 2010, Chevaux et al. 2010).

Außerdem lassen In-vitro-Studien eine azathioprin-induzierte Hepatotoxizität aufgrund von XO-induziertem oxidativem Stress vermuten (Tapner et al. 2004, Tapner; 2002, Farrell und Tapner 2002).

5.9.3. Inosin-triphosphat-pyrophosphathydrolase (ITPase)

Die ITPase katalysiert die Umwandlung von Thio-Inosin-Triphosphat in Thio-Inosin-Monophosphat (6-TITP), das ähnliche proapoptotische Eigenschaften wie 6-TGN hat und somit eine Myelosuppression verursachen kann (Marinaki et al. 2004, Lin et al. 2001). Patienten, die einen Mangel an ITPase haben, häufen 6-TITP an, da sie es nicht wieder zurück in TIMP umwandeln können. Eine Beteiligung an einer Myelosuppression belegen jedoch nicht alle Studien (Palmieri et al. 2007, Berg und Ford 2010). Eher werden mit einem Mangel an ITPase grippeähnliche Symptome oder Pankreatitis in Verbindung gebracht, weniger jedoch Leukopenien (Chevaux et al. 2010, Sahasranaman et al. 2008). Bisher wurden 5 SNP dieses Gens gefunden, wovon zwei Polymorphismen einen ITPase-Mangel verursachen könnten (94C → A, IVS2 + A21 → C) (Berg und Ford 2010, Sahasranaman et al. 2008, Sumi et al. 2002).

5.9.4. Variable number tandem repeats (VNTR)

Auch bei homozygoten Wildtypträgern gibt es bis zu 4-fach unterschiedliche TPMT-Aktivitäten, so dass wahrscheinlich weitere Faktoren vorliegen, die die Enzymaktivität beeinflussen. Ein Faktor könnten die VNTR sein (Shipkova und Ahsen 2003).

Unter VNTR versteht man Abschnitte der DNA, die aus tandemartigen Wiederholungen einer kurzen DNA-Sequenz bestehen. Solch ein VNTR wurde z. B. in der 5'-benachbarten Region des TPMT-Gens gefunden (Spire-Vayron de la Moureyre 1999). Der sich wiederholende Abschnitt war entweder 17 oder 18 Basenpaare lang, die häufigsten Varianten waren die mit 4 oder 5 Wiederholungen. Die TPMT-Aktivität war dabei invers zu der Anzahl der Wiederholungen, eine hohe Anzahl Wiederholungen korrelierte schwach mit niedriger Aktivität (Sahasranaman et al. 2008). Ebenso korreliert das Vorliegen bestimmter Sequenzmotive in dem Minisatelliten mit einer variablen TPMT-Aktivität (Yan et al. 2000, Spire-Vayron de la Moureyre et al. 1998, Spire-Vayron de la Moureyre 1999). Hindorf et al. fanden jedoch keinen Zusammenhang zwischen der TPMT-Aktivität und der Anzahl der VNTR (Hindorf et al. 2006), so dass hier weitere Untersuchungen nötig sind.

5.10. Resümee

Zusammenfassend ist festzustellen, dass es bei der untersuchten Patientengruppe mit RA keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen dem TPMT-Genotyp und dem Effekt der Azathioprintherapie gibt, so dass durch die Bestimmung des Genotyps (außer im Fall von homozygot-defizienten Patienten, die jedoch sehr selten vorkommen) keine konkrete Vorhersage möglich ist, ob der Patient von der Therapie profitieren wird und mit welcher Dosis man ihn therapieren sollte, damit er keine Leukopenie erleidet.

Dies ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass neben der TPMT noch weitere Enzyme (XO, HGPRT, ITPase) am Azathioprinmetabolismus beteiligt sind, deren Einfluss noch genauer untersucht werden muss und, dass nicht nur die 6-TGN die Wirkung bzw. Leukopenie hervorrufen, sondern auch noch andere Metaboliten wie MMPN, M-TGN, 6-TITP toxische Effekte verursachen können. Diese Tatsache legt die Vermutung nahe, dass ein therapeutisches Drug Monitoring von Azathioprin, 6-MP oder einem der Metaboliten hilfreich in der Therapiekontrolle wäre, doch leider hat sich in der Praxis keine dieser Substanzen als geeignet erwiesen.

Auch die TPMT-Phänotypisierung (TPMT-Aktivitätsbestimmung) ist nicht zuverlässig aussagekräftig, da, wie oben angeführt, noch weitere Einflüsse beim Azathioprinmetabolismus eine Rolle spielen, so dass keine direkte Korrelation zwischen TPMT-Aktivität und Therapieresultat besteht.

Kritisch zu bewerten ist, dass die Daten der vorliegenden Studie retrospektiv erhoben wurden und nur eine relativ geringe Anzahl Patienten zur Verfügung stand, so dass die hier vorgestellten Ergebnisse aus statistischer Sicht keine sehr hohe Power haben. Jedoch decken sich die Ergebnisse unserer Studie mit den Daten anderer Publikationen.

Die retrospektive Beobachtung erlaubt zwar keinen Einfluss auf das klinische Studiendesign, dafür wird hier die therapeutische Realität mit den unterschiedlichen, auf den einzelnen Patienten abgestimmten Behandlungsmethoden am ehesten widergespiegelt.

Die geringen Patientenzahlen stellen ebenfalls ein Problem dar, das sich durch fast alle Studien zu diesem Thema zieht. Inzwischen liegt jedoch auch eine Metaanalyse vor, so dass die Fragestellung an einem größeren Patientenkollektiv bewertet werden kann. Diese Metaanalyse, die 67 Studien umfasst, in denen 655 Fälle einer Myelosuppression ermittelt wurden, bestätigt die Ergebnisse, die in dieser Arbeit gefunden wurden. Von den dort ermittelten 655 Patienten mit Myelosuppression waren 68, 5 % Wildtypträger und es zeigte sich, dass die TPMT-Aktivität nicht vollständig mit dem Genotyp korreliert (Higgs et al. 2010). Leider war es bei unserer retrospektiven Arbeit nicht möglich, zusammen mit dem Genotyp auch die TPMT-Aktivität sowie die 6-TGN und MMPN-Konzentration zu bestimmen, um deren Einfluss auf das Therapieergebnis mit beurteilen zu können. Bei möglichen prospektiven Untersuchungen sollte das aber mit berücksichtigt werden.

6. Schlussfolgerungen

Azathioprin hat seit Jahren einen festen Platz in der Therapie von entzündlichen rheumatischen Erkrankungen und zeigt hier eine gute Wirksamkeit, gerade bei schweren und therapierefraktären Verläufen. Leider treten jedoch relativ häufig Nebenwirkungen auf (bis zu 15 %), die zum Teil auch schwerwiegend verlaufen, was den Einsatz von Azathioprin limitiert.

Eine wichtige Rolle im Azathioprinstoffwechsel spielt die TPMT. Von diesem Enzym ist ein genetischer Polymorphismus bekannt, der deutliche Auswirkungen auf die Aktivität der TPMT haben kann, was wiederum auch den Effekt der Azathioprintherapie beeinflusst. So haben homozygot-defiziente Patienten eine so geringe TPMT-Aktivität, dass sie das Endprodukt 6-TGN, das sowohl für den erwünschten Effekt als auch für Leukopenien verantwortlich sein soll, derart kumulieren, dass es zu schweren Leukopenien kommt. Unklar ist, in welchem Ausmaß ein heterozygoter Genotyp den Azathioprinstoffwechsel und damit auch den Effekt der Therapie beeinflusst.

Deshalb war es das Ziel dieser Arbeit, an Patienten mit entzündlich rheumatischen Erkrankungen zu untersuchen, ob es einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen dem Genotyp der Patienten und dem Effekt der Azathioprintherapie gibt und ob deshalb durch die Genotypisierung der Patienten eine Vorhersage möglich wäre, welche Patienten mit welcher Azathioprinosis therapiert werden sollten, um von der Therapie zu profitieren und keine Leukopenie zu entwickeln.

Die vorliegenden Ergebnisse sowie auch der Vergleich mit der Literatur haben gezeigt, dass es keine deutliche Korrelation zwischen Genotyp und Azathioprineffekt gibt. Deshalb erfüllt die Genotypisierung die in sie gesetzten Hoffnungen nicht. So ist es nur bei homozygot defizienten Patienten möglich, die Myelosuppression sicher vorher zu sagen. Homozygote Patienten sollten nicht mit Azathioprin therapiert werden. Der Anteil der homozygot-defizienten Patienten ist mit 0,3 % der Gesamtbevölkerung jedoch sehr gering, so dass der Hauptanteil der Patienten von der Genotypisierung nicht profitieren würde. Denn bei allen anderen Patienten lässt sich auch nach Genotypisierung nicht sicher vorhersagen, ob eine Leukopenie auftreten wird und mit welcher Dosis man den Patienten behandeln sollte. Deshalb müssen auch weiterhin bei allen Patienten engmaschig Blutspiegelkontrollen

durchgeführt werden, um eine sich entwickelnde Leukopenie bereits frühzeitig zu erkennen und entsprechend mit Dosisreduktion oder Absetzen von Azathioprin zu reagieren.

Auch andere Autoren haben eine TPMT-Genotypisierung für den routinemäßigen Einsatz nicht befürwortet, da es in den verschiedenen Studien zu viele unterschiedliche Ergebnisse bzgl. des Zusammenhangs von TPMT-Genotyp und Behandlungserfolg und dem Risiko, UAW zu entwickeln, gibt (Reuther et al. 2003). Da also weiterhin engmaschige Kontrollen der Leukozyten-, Erythrozyten- und Thrombozytenzahl durchgeführt werden müssen und ohnehin Blutbildkontrollen stattfinden, um Leber- und Entzündungsparameter sowie viele andere Laborwerte zu überprüfen, scheint eine gute Kosten-Nutzen-Relation mit der Genotypisierung nicht gegeben.

Dass es keinen linearen Zusammenhang zum Genotyp der TPMT gibt, kann mehrere Ursachen haben. So korreliert die TPMT-Aktivität (TPMT-Phänotyp) nicht mit dem Genotyp und kann auch noch durch andere Ursachen beeinflusst werden (Geschlecht, Komedikation, Azathioprin selbst, Alter). Außerdem scheinen nicht nur die entstehenden 6-TGN in zu hoher Konzentration toxisch zu sein, sondern auch noch andere Metaboliten, wie MMPN, M-TGN und 6-TITP (6-TITP steht im Verdacht, hepatotoxisch zu sein). Und letztendlich beeinflussen auch noch ganz andere Faktoren die Entwicklung einer Leukopenie, wie die Grunderkrankung selbst (z. B. bei SLE), virale Infektionen oder auch die Komedikation.

Aufgrund der in dieser Studie gefundenen Ergebnisse lautet deshalb die Empfehlung für den klinischen Alltag:

- Einschleichende Dosierung von Azathioprin, beginnend mit 1 mg/kg KG und Dosissteigerung nach 6 – 8 Wochen bei nicht ausreichendem Effekt, maximal jedoch bis zu 3 mg/kg KG
- Regelmäßige Blutbildkontrollen, zu Beginn engmaschiger, dann mit größeren Abständen; vorgeschlagen wird folgendes Schema (de Boer et al. 2007):
 - Baseline-Kontrolle, dann Blutentnahmen nach 1, 2, 4 und 12 Wochen
 - Bei guter Verträglichkeit weitere Kontrollen alle 3 Monate

Literaturverzeichnis

- Ameyaw MM, Collie-Duguid ESR, Powrie RH, Ofori-Adjei D, McLeod HL. 1999. Thiopurine methyltransferase alleles in British and Ghanaian populations. *Human Molecular Genetics*, 8 (2):367-370.
- Ammon. 2010. *Hunnius Pharmazeutisches Wörterbuch*. 10 Aufl. Berlin: De Gruyter.
- Ansari A, Hassan C, Duley J, Marinaki A, Shobowale-Bakre EM, Seed P, Meenan J, Yim A, Sanderson J. 2002. Thiopurine methyltransferase activity and the use of azathioprine in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 16 (10):1743-1750.
- Ansari A, Arenas M, Greenfield SM, Morris D, Lindsay J, Gilshenan K, Smith M, Lewis C, Marinaki A, Duley J, Sanderson J. 2008. Prospective evaluation of the pharmacogenetics of azathioprine in the treatment of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 28 (8):973-983.
- Anstey A, Lennard L, Mayou SC, Kirby JD. 1992. Pancytopenia related to azathioprine--an enzyme deficiency caused by a common genetic polymorphism: a review. *J R Soc Med*, 85 (12):752-756.
- Atreya I. 2005. Der molekulare Wirkungsmechanismus des Immunsuppressivums Azathioprin
- Bach JF, Dardenne M. 1971. Metabolism of Azathioprine in Renal Failure. *Transplantation*, 12 (4):253-259.
- Berg JD, Ford LT. 2010. Thiopurine S-methyltransferase (TPMT) assessment prior to starting thiopurine drug treatment; a pharmacogenomic test whose time has come. *Journal of Clinical Pathology*, 63 (4):288-295.
- Black AJ, McLeod HL, Capell HA, Powrie RH, Matowe LK, Pritchard SC, Collie-Duguid ES, Reid DM. 1998. Thiopurine methyltransferase genotype predicts therapy-limiting severe toxicity from azathioprine. *Ann Intern Med*, 129 (9):716-718.
- Chang JG, Lee LS, Chen CM, Shih MC, Wu MC, Tsai FJ, Liang DC. 2002. Molecular analysis of thiopurine S-methyltransferase alleles in South-east Asian populations. *Pharmacogenetics*, 12 (3):191-195.
- Chevaux JB, Peyrin-Biroulet L, Sparrow MP. 2010. Optimizing thiopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 17 (6):1428-1435.

- Chou AH, Tsai HF, Lin LL, Hsieh SL, Hsu PI, Hsu PN. 2001. Enhanced proliferation and increased IFN-gamma production in T cells by signal transduced through TNF-related apoptosis-inducing ligand. *Journal of immunology*, 167 (3):1347-1352.
- Clunie GP, Lennard L. 2004. Relevance of thiopurine methyltransferase status in rheumatology patients receiving azathioprine. *Rheumatology (Oxford)*, 43 (1):13-18.
- Coffey JJ, Serpick AA, White CA, Rogers WI, Lesk AB. 1972. Effect of Allopurinol on Pharmacokinetics of 6-Mercaptopurine (Nsc 755) in Cancer-Patients. *Cancer Research*, 32 (6):1283-1289.
- Collie-Duguid ES, Pritchard SC, Powrie RH, Sludden J, Collier DA, Li T, McLeod HL. 1999. The frequency and distribution of thiopurine methyltransferase alleles in Caucasian and Asian populations. *Pharmacogenetics*, 9 (1):37-42.
- Colombel JF, Ferrari N, Debuysere H, Marteau P, Gendre JP, Bonaz B, Soule JC, Modigliani R, Touze Y, Catala P, Libersa C, Broly F. 2000. Genotypic analysis of thiopurine S-methyltransferase in patients with Crohn's disease and severe myelosuppression during azathioprine therapy. *Gastroenterology*, 118 (6):1025-1030.
- Corominas H, Domenech M, Laiz A, Gich I, Geli C, Diaz C, de Cuvillas F, Moreno M, Vazquez G, Baiget M. 2003. Is thiopurine methyltransferase genetic polymorphism a major factor for withdrawal of azathioprine in rheumatoid arthritis patients? *Rheumatology (Oxford)*, 42 (1):40-45.
- Coulthard SA, Hogarth LA, Little M, Matheson EC, Redfern CP, Minto L, Hall AG. 2002. The effect of thiopurine methyltransferase expression on sensitivity to thiopurine drugs. *Mol Pharmacol*, 62 (1):102-109.
- Cuffari C, Theoret Y, Latour S, Seidman G. 1996. 6-Mercaptopurine metabolism in Crohn's disease: Correlation with efficacy and toxicity. *Gut*, 39 (3):401-406.
- Daczo J. 2007. Azathioprin bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen: Erfahrungen im Einsatz bei Remissionsinduktion und Remissionserhaltung
- de Boer NK, van Bodegraven AA, Jharap B, de Graaf P, Mulder CJ. 2007. Drug Insight: pharmacology and toxicity of thiopurine therapy in patients with IBD. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, 4 (12):686-694.
- DGRh S1-Leitlinie: Medikamentöse Therapie der rheumatoiden Arthritis
http://dgrh.de/fileadmin/media/Praxis_Klinik/Leitlinien/2012/leitlinie_s1_medikamentoes_therapie_ra.pdf.

- Dubinsky MC, Lamothe S, Yang HY, Targan SR, Sinnett D, Theoret Y, Seidman EG. 2000. Pharmacogenomics and metabolite measurement for 6-mercaptopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 118 (4):705-713.
- Dubinsky MC, Yang H, Hassard PV, Seidman EG, Kam LY, Abreu MT, Targan SR, Vasiliauskas EA. 2002. 6-MP metabolite profiles provide a biochemical explanation for 6-MP resistance in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 122 (4):904-915.
- Duley JA, Florin TH. 2005. Thiopurine therapies: problems, complexities, and progress with monitoring thioguanine nucleotides. *Ther Drug Monit*, 27 (5):647-654.
- Elion GB. 1967. Biochemistry and Pharmacology of Purine Analogues. *Federation Proceedings*, 26 (3):898-904.
- Elion GB. 1972. Significance of Azathioprine Metabolites. *Proceedings of the Royal Society of Medicine-London*, 65 (3): 256-260
- Elion GB. 1989. The Purine Path to Chemotherapy (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie-International Edition in English*, 28 (7):870-878.
- Evans WE, Hon YY, Bomgaars L, Coutre S, Holdsworth M, Janco R, Kalwinsky D, Keller F, Khatib Z, Margolin J, Murray J, Quinn J, Ravindranath Y, Ritchey K, Roberts W, Rogers ZR, Schiff D, Steuber C, Tucci F, Kornegay N, Krynetski EY, Relling MV. 2001. Preponderance of thiopurine S-methyltransferase deficiency and heterozygosity among patients intolerant to mercaptopurine or azathioprine. *J Clin Oncol*, 19 (8):2293-2301.
- Farrell G, Tapner M. 2002. In vitro hepatotoxicity of azathioprine at pharmacologic concentrations: Roles of xanthine oxidase, oxidative stress and mitochondrial injury. *Journal of hepatology*, 36:146-146.
- Gearry RB, Barclay ML, Burt MJ, Collett JA, Chapman BA, Roberts RL, Kennedy MA. 2003. Thiopurine S-methyltransferase (TPMT) genotype does not predict adverse drug reactions to thiopurine drugs in patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 18 (4):395-400.
- GlaxoSmithKline. 2007. Fachinformation Imurek
- Hatz HJ. 2007. Rheumatologie to go. 1 Aufl. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
- Hettenkofer H-J. 2003. Rheumatologie. 5 Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

- Higgs JE, Payne K, Roberts C, Newman WG. 2010. Are patients with intermediate TPMT activity at increased risk of myelosuppression when taking thiopurine medications? *Pharmacogenomics*, 11 (2):177-188.
- Hindorf U, Lindqvist M, Peterson C, Soderkvist P, Strom M, Hjortswang H, Pousette A, Almer S. 2006. Pharmacogenetics during standardised initiation of thiopurine treatment in inflammatory bowel disease. *Gut*, 55 (10):1423-1431.
- Hippius M. 1993. Untersuchungen zum effektiven Einsatz von Azathioprin, Sulfasalazin und Indometacin in der Therapie chronisch entzündlicher Erkrankungen Jena: Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Hon YY, Fessing MY, Pui CH, Relling MV, Krynetski EY, Evans WE. 1999. Polymorphism of the thiopurine S-methyltransferase gene in African-Americans. *Human Molecular Genetics*, 8 (2):371-376.
- ifap. 2013. ifap index klinik; ifap Service-Institut für Ärzte und Apotheker GmbH
<http://www.ifap.de>
- Jun JB, Cho DY, Kang C, Bae SC. 2005. Thiopurine S-methyltransferase polymorphisms and the relationship between the mutant alleles and the adverse effects in systemic lupus erythematosus patients taking azathioprine. *Clin Exp Rheumatol*, 23 (6):873-876.
- Karlson D, Koolman J, Fuchs G, Gerok W. 2005. Karlsons Biochemie und Pathologie. 15 Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag
- Kerstens PJ, Stolk JN, De Abreu RA, Lambooy LH, van de Putte LB, Boerbooms AA. 1995. Azathioprine-related bone marrow toxicity and low activities of purine enzymes in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 38 (1):142-145.
- Klemetsdal B, Straume B, Wist E, Aarbakke J. 1993. Identification of factors regulating thiopurine methyltransferase activity in a Norwegian population. *European journal of clinical pharmacology*, 44 (2):147-152.
- Krynetski EY, Evans WE. 1999. Pharmacogenetics as a molecular basis for individualized drug therapy: the thiopurine S-methyltransferase paradigm. *Pharmaceutical research*, 16 (3):342-349.
- Krynetski EY, Evans WE. 2000. Genetic polymorphism of thiopurine S-methyltransferase: molecular mechanisms and clinical importance. *Pharmacology*, 61 (3):136-146.

- Krynetski EY, Tai HL, Yates CR, Fessing MY, Loennechen T, Schuetz JD, Relling MV, Evans WE. 1996. Genetic polymorphism of thiopurine S-methyltransferase: clinical importance and molecular mechanisms. *Pharmacogenetics*, 6 (4):279-290.
- Kubota T, Chiba K. 2001. Frequencies of thiopurine S-methyltransferase mutant alleles (TPMT*2, *3A, *3B and *3C) in 151 healthy Japanese subjects and the inheritance of TPMT*3C in the family of a propositus. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 51 (5):475-477.
- Lennard L. 1992. The clinical pharmacology of 6-mercaptopurine. *Eur J Clin Pharmacol*, 43 (4):329-339.
- Lennard L. 1998. Clinical implications of thiopurine methyltransferase--optimization of drug dosage and potential drug interactions. *Ther Drug Monit*, 20 (5):527-531.
- Lennard L, Murphy MF, Maddocks JL. 1984. Severe megaloblastic anaemia associated with abnormal azathioprine metabolism. *British journal of clinical pharmacology*, 17 (2):171-172.
- Lennard L, Van Loon JA, Weinshilboum RM. 1989. Pharmacogenetics of acute azathioprine toxicity: relationship to thiopurine methyltransferase genetic polymorphism. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 46 (2):149-154.
- Lennard L, Lilleyman JS, Van Loon J, Weinshilboum RM. 1990. Genetic variation in response to 6-mercaptopurine for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*, 336 (8709):225-229.
- Leuschner U. 2006. Immunsuppressive Therapie mit Azathioprin bei chronischen Lebererkrankungen. 5 Aufl. Freiburg: Dr. Falk Pharma GmbH
- Lin SR, McLennan AG, Ying K, Wang Z, Gu SH, Jin H, Wu CQ, Liu WP, Yuan YZ, Tang R, Xie Y, Mao YM. 2001. Cloning, expression, and characterization of a human inosine triphosphate pyrophosphatase encoded by the ITPA gene. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (22):18695-18701.
- Lowry PW, Franklin CL, Weaver AL, Pike MG, Mays DC, Tremaine WJ, Lipsky JJ, Sandborn WJ. 2001. Measurement of thiopurine methyltransferase activity and azathioprine metabolites in patients with inflammatory bowel disease. *Gut*, 49 (5):665-670.
- Marinaki AM, Ansari A, Duley JA, Arenas M, Sumi S, Lewis CM, Shobowale-Bakre el M, Escuredo E, Fairbanks LD, Sanderson JD. 2004. Adverse drug reactions to azathioprine

- therapy are associated with polymorphism in the gene encoding inosine triphosphate pyrophosphatase (ITPase). *Pharmacogenetics*, 14 (3):181-187.
- McGovern DPB, Travis SPL, Duley J, Shobowale-Bakre EM, Dalton HR. 2002. Azathioprine intolerance in patients with IBD may be imidazole-related and is independent of TPMT activity. *Gastroenterology*, 122 (3):838-839.
- McLeod HL, Krynetski EY, Relling MV, Evans WE. 2000. Genetic polymorphism of thiopurine methyltransferase and its clinical relevance for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK*, 14 (4):567-572.
- McLeod HL, Lin JS, Scott EP, Pui CH, Evans WE. 1994. Thiopurine methyltransferase activity in American white subjects and black subjects. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 55 (1):15-20.
- McLeod HL, Pritchard SC, Githang'a J, Indalo A, Ameyaw MM, Powrie RH, Booth L, Collie-Duguid ESR. 1999. Ethnic differences in thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: evidence for allele specificity in Caucasian and Kenyan individuals. *Pharmacogenetics*, 9 (6):773-776.
- MedlinePlus Methotrexat
<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo/meds/a682019.html>.
- Mikus G. 2000. Klinische Relevanz von Polymorphismen des Arzneimittelstoffwechsels. *Therapeutische Umschau*, 57 (9).
- Naughton MA, Battaglia E, O'Brien S, Walport MJ, Botto M. 1999. Identification of thiopurine methyltransferase (TPMT) polymorphisms cannot predict myelosuppression in systemic lupus erythematosus patients taking azathioprine. *Rheumatology (Oxford)*, 38 (7):640-644.
- Otterness D, Szumlanski C, Wood T, Lennard L, Klemetsdal B, Aarbakke J, ParkHah J, Iven H, Branum E, OBrien J, Weinshilboum R. 1997. Thiopurine methyltransferase (TPMT) pharmacogenetics: Polymorphism characterization. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 61 (2):Oib4-Oib4.
- Pagnoux C, Mahr A, Hamidou MA, Boffa JJ, Ruivard M, Ducroix JP, Kyndt X, Lifermann F, Papo T, Lambert M, Le Noach J, Khellaf M, Merrien D, Puechal X, Vinzio S, Cohen P, Mouthon L, Cordier JF, Guillevin L. 2008. Azathioprine or methotrexate maintenance for ANCA-associated vasculitis. *N Engl J Med*, 359 (26):2790-2803.

- Palmieri O, Latiano A, Bossa F, Vecchi M, D'Inca R, Guagnozzi D, Tonelli F, Cucchiara S, Valvano MR, Latiano T, Andriulli A, Annese V. 2007. Sequential evaluation of thiopurine methyltransferase, inosine triphosphate pyrophosphatase, and HPRT1 genes polymorphisms to explain thiopurines' toxicity and efficacy. *Aliment Pharmacol Ther*, 26 (5):737-745.
- Puchner R. 2010. *Rheumatologie aus der Praxis*. 1 Aufl. Wien: Springer-Verlag.
- Reuther LO, Vainer B, Sonne J, Larsen NE. 2004. Thiopurine methyltransferase (TPMT) genotype distribution in azathioprine-tolerant and -intolerant patients with various disorders. The impact of TPMT genotyping in predicting toxicity. *Eur J Clin Pharmacol*, 59 (11):797-801.
- Reuther LO, Sonne J, Larsen NE, Larsen B, Christensen S, Rasmussen SN, Tofteng F, Haaber A, Johansen N, Kjeldsen J, Schmiegelow K. 2003. Pharmacological monitoring of azathioprine therapy. *Scand J Gastroenterol*, 38 (9):972-977.
- Sahasranaman S, Howard D, Roy S. 2008. Clinical pharmacology and pharmacogenetics of thiopurines. *Eur J Clin Pharmacol*, 64 (8):753-767.
- Schaeffeler E, Fischer C, Brockmeier D, Wernet D, Moerike K, Eichelbaum M, Zanger UM, Schwab M. 2004. Comprehensive analysis of thiopurine S-methyltransferase phenotype-genotype correlation in a large population of German-Caucasians and identification of novel TPMT variants. *Pharmacogenetics*, 14 (7):407-417.
- Schedel J, Godde A, Schutz E, Bongartz TA, Lang B, Scholmerich J, Muller-Ladner U. 2006. Impact of thiopurine methyltransferase activity and 6-thioguanine nucleotide concentrations in patients with chronic inflammatory diseases. *Basic and Clinical Aspects of Neuroendocrine Immunology in Rheumatic Diseases*, 1069:477-491.
- Schwab M, Klotz U. 2001. Pharmacokinetic considerations in the treatment of inflammatory bowel disease. *Clin Pharmacokinet*, 40 (10):723-751.
- Schwab M, Herrlinger K, Schaeffeler E, Stange EF. 2003. [Therapy of chronic inflammatory bowel diseases with azathioprine, 6-mercaptopurine and 6-thioguanine. Clinico-pharmacologic aspects]. *Dtsch Med Wochenschr*, 128 (8):378-385.
- Schwab M, Schaeffeler E, Marx C, Fischer C, Lang T, Behrens C, Gregor M, Eichelbaum M, Zanger UM, Kaskas BA. 2002. Azathioprine therapy and adverse drug reactions in patients with inflammatory bowel disease: impact of thiopurine S-methyltransferase polymorphism. *Pharmacogenetics*, 12 (6):429-436.

- Seki T, Tanaka T, Nakamura Y. 2000. Genomic structure and multiple single-nucleotide polymorphisms (SNPs) of the thiopurine S-methyltransferase (TPMT) gene. *Journal of Human Genetics*, 45 (5):299-302.
- Shipkova M, von Ahsen N. 2003. Therapie mit Thiopurin-Medikamenten-TDM und Pharmakogenomik der TPMT. *J Lab Med*, 27 (5/6):211-221.
- Spire-Vayron de la Moureyre C, Debuysere H, Fazio F, Sergent E, Bernard C, Sabbagh N, Marez D, Lo Guidice JM, D'Halluin J C, Broly F. 1999. Characterization of a variable number tandem repeat region in the thiopurine S-methyltransferase gene promoter. *Pharmacogenetics*, 9 (2): 189-198
- Spire-Vayron de la Moureyre C, Debuysere H, Mastain B, Vinner E, Marez D, Lo Guidice JM, Chevalier D, Brique S, Motte K, Colombel JF, Turck D, Noel C, Flipo RM, Pol A, Lhermitte M, Lafitte JJ, Libersa C, Broly F. 1998. Genotypic and phenotypic analysis of the polymorphic thiopurine S-methyltransferase gene (TPMT) in a European population. *Br J Pharmacol*, 125 (4):879-887.
- Stolk JN, Boerbooms AM, de Abreu RA, de Koning DG, van Beusekom HJ, Muller WH, van de Putte LB. 1998. Reduced thiopurine methyltransferase activity and development of side effects of azathioprine treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 41 (10):1858-1866.
- Sumi S, Marinaki AM, Arenas M, Fairbanks L, Shobowale-Bakre M, Rees DC, Thein SL, Ansari A, Sanderson J, De Abreu RA, Simmonds HA, Duley JA. 2002. Genetic basis of inosine triphosphate pyrophosphohydrolase deficiency. *Hum Genet*, 111 (4-5):360-367.
- Szumilanski C, Otterness D, Her C, Lee D, Brandriff B, Kelsell D, Spurr N, Lennard L, Wieben E, Weinshilboum R. 1996. Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: human gene cloning and characterization of a common polymorphism. *DNA Cell Biol*, 15 (1):17-30.
- Tai HL, Krynetski EY, Schuetz EG, Yanishevski Y, Evans WE. 1997. Enhanced proteolysis of thiopurine S-methyltransferase (TPMT) encoded by mutant alleles in humans (TPMT*3A, TPMT*2): mechanisms for the genetic polymorphism of TPMT activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94 (12):6444-6449.

- Tapner MJ, Jones BE, Wu WM, Farrell GC. 2004. Toxicity of low dose azathioprine and 6-mercaptopurine in rat hepatocytes. Roles of xanthine oxidase and mitochondrial injury. *Journal of hepatology*, 40 (3):454-463.
- von Andrian UH, Engelhardt B. 2003. Alpha4 integrins as therapeutic targets in autoimmune disease. *The New England journal of medicine*, 348 (1):68-72.
- Weinshilboum R. 1989. Methyltransferase pharmacogenetics. *Pharmacology & therapeutics*, 43 (1):77-90.
- Weinshilboum R. 2001. Thiopurine pharmacogenetics: clinical and molecular studies of thiopurine methyltransferase. *Drug Metab Dispos*, 29 (4 Pt 2):601-605.
- Weinshilboum RM, Sladek SL. 1980. Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *American journal of human genetics*, 32 (5):651-662.
- Weinshilboum RM, Otterness DM, Szumlanski CL. 1999. Methylation pharmacogenetics: Catechol O-methyltransferase, thiopurine methyltransferase, and histamine N-methyltransferase. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 39:19-52.
- Weller S, Thurmann P, Rietbrock N, Gossmann J, Scheuermann EH. 1995. HPLC analysis of azathioprine metabolites in red blood cells, plasma and urine in renal transplant recipients. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 33 (12):639-645.
- Whisnant JK, Pelkey J. 1982. Rheumatoid arthritis: treatment with azathioprine (IMURAN (R)). Clinical side-effects and laboratory abnormalities. *Ann Rheum Dis*, 41 Suppl 1:44-47.
- Woodson LC, Weinshilboum RM. 1983. Human kidney thiopurine methyltransferase. Purification and biochemical properties. *Biochemical pharmacology*, 32 (5):819-826.
- Yamamoto H, Kishimoto T, Minamoto S. 1998. NF-kappaB activation in CD27 signaling: involvement of TNF receptor-associated factors in its signaling and identification of functional region of CD27. *Journal of immunology*, 161 (9):4753-4759.
- Yan L, Zhang S, Eiff B, Szumlanski CL, Powers M, O'Brien JF, Weinshilboum RM. 2000. Thiopurine methyltransferase polymorphic tandem repeat: genotype-phenotype correlation analysis. *Clin Pharmacol Ther*, 68 (2):210-219.
- Yates CR, Krynetski EY, Loennechen T, Fessing MY, Tai HL, Pui CH, Relling MV, Evans WE. 1997. Molecular diagnosis of thiopurine S-methyltransferase deficiency: Genetic

basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance. *Annals of Internal Medicine*, 126 (8):608-+.

Zimm S, Collins JM, Oneill D, Chabner BA, Poplack DG. 1983. Inhibition of 1st-Pass Metabolism in Cancer-Chemotherapy - Interaction of 6-Mercaptopurine and Allopurinol. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 34 (6):810-817.

Anhang

SOP 1

DNA-Isolierung nach Quiagen

Universitätsklinikum Jena
Institut für Pharmakologie und Toxikologie

- (1) 200 µl EDTA-Blut
20 µl Protease
200 µl Puffer AL

pipettieren, sofort 15 sec. Vortexen

- (2) 10 min bei 56°C 10 min inkubieren
- (3) 200 µl Ethanol 96 % zugeben, 15 sec, vortexen, kurz anzentrifugieren
- (4) Lösung in Säulchen überführen, 1 min bei 8000 rpm zentrifugieren
- (5) Unterstand verwerfen, 500 µl Puffer AW1 zugeben, 1 min bei 8000 rpm zentrifugieren
- (6) Unterstand verwerfen, 500 µl Puffer AW2 zugeben, 3 min bei 14000 rpm zentrifugieren; die Säule muss vollständig trocken sein, sonst noch einmal zentrifugieren.
- (7) Lösung vorsichtig in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettieren
- (8) 160 µl Puffer AE zugeben, 1 min bei Raumtemperatur inkubieren
- (9) 1 min bei 8000 rpm zentrifugieren, Säule verwerfen, Reaktionsgefäß mit Klebepunkt und Nummer versehen

DNA bei -20°C lagern

SOP 2

PCR und Elektrophorese für das Allel G 238 C

Universitätsklinikum Jena
Institut für Pharmakologie und Toxikologie

Mastermix (MM) für PCR G 238 C (allelspezifisch)

19,8 µl Wasser
2,5 µl Puffer free
0,5 µl dNTP
0,5 µl Primer P2C
0,5 µl Primer P2W bzw. P2M
0,2 µ Polymerase

1 µl DNA + 24 µl MM in Reaktionsgefäß pipettieren

PCR: 3 min/95 °C – 38 x (45 sec/95 °C – 45 sec/55 °C – 45 sec/72 °C) 5 min/72 °C

Primerverdünnung

Primer für Wildtyp:

P2W (GTA TGA TTT TAT GCA GGT TTG): 50 µl Stammlsg. + 195 µl Wasser

Primer für Mutation:

P2M (GTA TGA TTT TAT GCA GGT TTC): 50 µl Stammlsg. + 226 µl Wasser

Primer für komplementären DNA-Strang:

P2C (TAA ATA GGA ACC ATC GGA CAC): 50 µl Stammlsg. + 231 µl Wasser




Elektrophorese: 2 % iges Agarosegel

Bande: 256 bp

Auswertung:

1. PCR-Ansatz: enthält Primer P2C und Primer P2W
2. PCR-Ansatz: enthält Primer P2C und Primer P2M

Mögliche Banden:

Patient 1	Patient 2	Patient 3
		
PCR 1 PCR 2	PCR 1 PCR 2	PCR 1 PCR 2
wt/wt	wt/m	m/m

SOP 3

PCR und Elektrophorese für das Allel G 460 C

Universitätsklinikum Jena
Institut für Pharmakologie und Toxikologie

Mastermix (MM) für PCR G 460 C (allelspezifisch)

18,3 µl Wasser
2,5 µl Pufferfree
1,5 µl MgCl₂
0,5 µl dNTP
0,5 µl Primer 460 F
0,5 µl Primer 460 R
0,2 µ Polymerase

1 µl DNA + 24 µl MM in Reaktionsgefäß pipettieren

PCR: 3 min/95 °C – 38 x (45 sec/95 °C – 45 sec/59 °C – 45 sec/72 °C) 5 min/72 °C

Primerverdünnung

Vorwärtsprimer:

P 460 F (ATA ACA GAG TGG GGA GGC TGC): 50 µl Stammlsg. + 293 µl Wasser

Rückwärtsprimer:

P 460 R (CTA GAA CCC AGA AAA AGT ATA G): 50 µl Stammlsg. + 268 µl Wasser

Verdau:

1,0 µl Wasser
3,0 µl Puffer
1,0 µl Mwo I

5 µl MM + 25 µl Amplifikat in Reaktionsgefäß pipettieren, 2 h bei 60 °C inkubieren

Elektrophorese: 2 % iges Agarosegel

Auswertung

365 bp		_____	_____
267 bp	_____	_____	
98 bp	-----	-----	
	wt/wt	mt/m	m/m

SOP 4

PCR und Elektrophorese für das Allel A 719 G

Universitätsklinikum Jena
Institut für Pharmakologie und Toxikologie

Mastermix (MM) für PCR A 719 G (allelspezifisch)

17,4 µl Wasser
2,5 µl Puffer free
2,4 µl MgCl₂
0,5 µl dNTP
0,5 µl Primer 719 F
0,5 µl Primer 719 R
0,2 µ Polymerase

1 µl DNA + 24 µl MM in Reaktionsgefäß pipettieren

PCR: 3 min/95 °C – 38 x (45 sec/95 °C – 30 sec/60 °C – 45 sec/72 °C) 5 min/72 °C

Primerverdünnung

Vorwärtsprimer:

P 719 F (TGT TGG GAT TAC AGG TGT GAG CCA C): 50 µl Stammlsg + 293 µl Wasser

Rückwärtsprimer:

P 719 R (CAG GCT TTA GCA TAA TTT TCA ATT CCT C): 50 µl Stammlsg + 268 µl Wasser

Verdau:

1,7 µl Wasser
3,0 µl Puffer
0,3 µl Acc I

5 µl MM + 25 µl Amplifikat in Reaktionsgefäß pipettieren, 2 h bei 37 °C inkubieren

Elektrophorese: 2%iges Agarosegel (Agarosegemisch 3:1)

Auswertung

293 bp	_____	_____	
267 bp		_____	_____
98 bp		-----	-----
	wt/wt	mt/m	m/m

SOP 5

Elektrophorese

Universitätsklinikum Jena
Institut für Pharmakologie und Toxikologie

- Gelschlitten so in die Elektrophoresekammer einlegen, dass die Gummidichtung mit der Elektrophoresekammer abschließt.
- Sowohl für die Elektrophorese als auch für die Gele TE-Puffer von GIBCO verwenden, der Puffer wird zur Gebrauchslösung 1:10 verdünnt
- Für kleine Gele ca. 50 - 60 ml TE-Puffer verwenden, für große Gele ca. 120 ml

Herstellung des Agarosegels:

- Benötigte Menge Puffer abmessen und in ein hohes Becherglas füllen
- entsprechend abgewogene Menge Agarose zugeben
- nach dem Mischen der Lösung kocht man diese in der Mikrowelle auf, bis sie aufschäumt
- nachdem sich der Schaum gesetzt hat, 2 µl bzw. 4 µl Ethidiumbromid (1% ig) zugeben (Handschuhe tragen!)
- das Gel abkühlen lassen und in den Gelschlitten gießen
- die Kämme einsetzen, das Gel erkalten lassen

Elektrophorese

- Wenn das Gel fest ist, Gummidichtung und Kämme vorsichtig entfernen und das Gel in die Elektrophoresekammer einsetzen
- Pufferlösung aufgießen, bis das Gel knapp bedeckt ist
- etwas Ethidiumbromid zugeben, um ein Ausbluten des Gels zu verhindern
- Proben mit OrangeG oder Blue-Run versetzen und in die Geltaschen einfüllen
- Elektrophoresekammer verschließen und Spannung anlegen, wobei niedrigprozentige Gele (bis zu 1 %) bei 100 – 120 V und hochprozentige Gele (1 - 4 %) bei 80 V laufen sollten.
- befindet sich der Farbstoff im unteren Teil des Gels, ist die Elektrophorese fertig.
- das Gel wird entnommen und abfotografiert

Vorsicht

Gele und Puffer enthalten hochgiftiges Ethidiumbromid. Deshalb müssen bei allen Arbeiten Handschuhe getragen und die Gele im Sonderabfall für Zytostatika entsorgt werden.

Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei Frau PD Dr. rer. nat. habil. M. Hippus für die Überlassung des Themas, die tatkräftige Förderung und konstruktive Kritik bedanken sowie für das Vertrauen während der Bearbeitung des Themas.

Bedanken möchte ich mich auch bei Sylvia Kellert, die mich bei der Durchführung der Genotypisierung unterstützte, sowie bei Dr. rer. nat. Mario Walther, der mich bei der statistischen Auswertung der Daten kompetent beraten hat.

Weiterhin bedanke ich mich bei Dr. Eidner für die Mithilfe bei der Erfassung der Patientendaten sowie den bereitwillig teilnehmenden Patienten der Klinik für Rheumatologie und Osteologie.

Ein großes Dankeschön geht an Dorothea Gruca, die immer ein offenes Ohr hatte und mir während aller Höhen und Tiefen hilfreich zur Seite stand.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Söhnen Jakob und Jonas sowie bei meinem Mann Hubert bedanken, die die lange Durststrecke tapfer ertragen und mich so gut es ging entlastet und (auch fachlich) unterstützt haben.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Frau PD Dr. rer. nat. habil. Marion Hippus, Dr. rer. nat. Mario Walther
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde, und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen
- ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und
- dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 21.03.2013

Astrid Scheuerlein